

ANA CAROLINA DE CARVALHO

**ANÁLISE DE PROCESSOS DE MICROVINIFICAÇÃO DA
CULTIVAR CABERNET SAUVIGNON POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA, ESPECTROSCOPIA NA
REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FT-IR) E QUIMIOMETRIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tania M. B. Bonfim
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin

CURITIBA

2007

Aos meus pais Neri e Maria Elisa
por servirem de exemplo para a
minha vida e me motivarem a
sempre seguir em frente.

“A sabedoria não nos é dada; é preciso descobri-la por nós mesmos depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós.”

Marcel Proust

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná e aos seus professores pela oportunidade e por participarem da minha formação.

À Profa. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim pela orientação, ensinamentos, otimismo, paciência, amizade e por sempre ter acreditado em mim.

Ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin pela co-orientação e grande ajuda na elaboração deste trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório de Químio/Biotecnologia de Biomassa, Prof. Dr. José Domingos Fontana pela cordialidade e por ter permitido a utilização de equipamentos e materiais para a realização das análises dos processos, Dr. Maurício Passos pela disponibilidade e pela ajuda com as análises de cromatografia líquida de alta eficiência e a Adélia Grzybowski pelo incentivo e amizade.

À Profa. Dra. Ivonne Delgadillo e a Maria Beatriz da Rocha Veleirinho do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

A Profa. Dra. Sandra Mara Woranovicz Barreira, Prof. Aguinaldo J. do Nascimento, Profa. Dra. Ângela C. L. Badaró Trindade e Profa. Dra. Lygia M. M. de Campos pelas ajudas concedidas durante o trabalho.

Ao Prof. Cassyano J. Correr pelo auxílio nas análises estatísticas dos resultados.

À Shirley Kuhnen do Laboratório do Morfogenese e Bioquímica Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina.

Aos amigos e parceiros de trabalho do Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, Gisele P. Leitao, Thaís M. Guimarães, Priscila L. L. Silva e Rodrigo B. Cordeiro pelo companheirismo e ajudas prestadas e aos funcionários do laboratório, em especial a Ana Lúcia V. da Silveira e Jocy D. Cristo, pelo carinho e auxílios durante a realização dos trabalhos.

Aos colegas Janaína Packer, Andrezza Oliveira, Lorena Graef, Christian Siebra e demais colegas de pós-graduação pelo convívio e incentivos.

Aos meus amigos Josiele Polzin, Luciana Barazzetti e Everton Trindade pelo apoio e por entenderem a minha ausência. Em especial a Juliana N. Borges, minha querida prima Juliana Almeida, pela amizade sincera e pelos saudosos momentos de descontração no Karina.

Ao meu irmão Rafael C. de Carvalho que mesmo longe sempre me incentivou.

À Paulo Edson Machado por pelo amor, apoio incondicional, paciência e compreensão.

À Deus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	3
2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	4
3.1 UVA	4
3.2 LEVEDURA	5
3.3 ELABORAÇÃO DO VINHO TINTO	7
3.3.1 Maturação e Colheita	7
3.3.2 Separação da Ráquis e Esmagamento	9
3.3.3 Correções e Aditivos	9
3.3.4 Adição das Leveduras	10
3.3.5 Processo de Fermentação Vínica	10
3.4 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO VINHO	14
3.5 COMPONENTES QUÍMICOS DO MOSTO E DO VINHO	15
3.5.1 Açúcares Totais	16
3.5.2 Ácidos Orgânicos	16
3.5.3 Álcoois	17
3.5.4 Compostos Fenólicos	18
3.6 METODOLOGIAS EM ANÁLISE DE VINHO	21
3.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	22
3.6.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho	23
3.6.3 Quimiometria	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 MATERIAL	26
4.1.1 Uvas	26
4.1.2. Microrganismo	26
4.1.3. Reagentes, Meios de cultura e Gás nitrogênio	26
4.2 MÉTODOS	26
4.2.1 Métodos Gerais	26
4.2.2 Processos de Microvinificação	27
4.2.3 Determinação de Açúcares Totais	29
4.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	29
4.2.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho	31
4.2.6 Análises Estatísticas	31

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 PROCESSOS DE MICROVINIFICAÇÃO	32
5.1.1 Controle de Esterilidade	37
5.1.2 Determinação de Glucose, Frutose e Etanol	38
5.1.3 Compostos Fenólicos	43
5.1.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho	1
5.1.5 Quimiometria	8
6. CONCLUSÃO	17
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – VIA DA METABOLIZAÇÃO DOS AÇÚCARES PELA LEVEDURA	12
FIGURA 2 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÁCIDOS FENÓLICOS: ÁCIDO CINÂMICO, ÁCIDO p-COUMÁRICO E ÁCIDO CAFÉICO.....	19
FIGURA 3 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS FLAVANÓIDES EPICATEQUINA E QUERCITINA.....	20
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO <i>trans</i> -RESVERATROL.....	21
FIGURA 5 – FREQUÊNCIAS DE ABSORÇÃO CARACTERÍSTICAS DE GRUPAMENTOS FUNCIONAIS NA REGIÃO ESPECTRAL DE INFRAVERMELHO MÉDIO (600 – 4000 cm ⁻¹).....	24
FIGURA 6 – VARIAÇÃO DOS VALORES DE pH EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “A” UTILIZANDO MOSTO DE UVA SEM PELÍCULAS COM ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIEDADE <i>bayanus</i>	34
FIGURA 7 – VARIAÇÃO DOS VALORES DE pH EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “B” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS E ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIEDADE <i>bayanus</i>	34
FIGURA 8 – VARIAÇÃO DOS VALORES DE pH EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “D” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS SULFITADO E ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIEDADE <i>bayanus</i>	35
FIGURA 9 – VARIAÇÃO DOS VALORES DE pH EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “E” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS EM FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA	37
FIGURA 10 – CONSUMO DE GLUCOSE E FRUTOSE (g/L) E PRODUÇÃO DE ETANOL (% v/v) EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “A” UTILIZANDO MOSTO DE UVA SEM PELÍCULAS COM ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIEDADE <i>bayanus</i>	38
FIGURA 11 – CONSUMO DE GLUCOSE E FRUTOSE (g/L) E PRODUÇÃO DE ETANOL (% v/v) EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “B” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS E ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIEDADE <i>bayanus</i>	39
FIGURA 12 – CONSUMO DE GLUCOSE E FRUTOSE (g/L) E PRODUÇÃO DE ETANOL (% v/v) EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “D” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS SULFITADO E ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIEDADE <i>bayanus</i>	39

FIGURA 13 – PRODUÇÃO DE ETANOL EM FUNÇÃO DO CONSUMO DE GLUCOSE E FRUTOSE NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “A” UTILIZANDO MOSTO DE UVA SEM PELÍCULAS COM ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIEDADE <i>bayanus</i> ANALISADOS POR REGRESSÃO LINEAR SIMPLES	41
FIGURA 14 – PRODUÇÃO DE ETANOL EM FUNÇÃO DO CONSUMO DE GLUCOSE E FRUTOSE NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “B” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS E ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIEDADE <i>bayanus</i> ANALISADO POR REGRESSÃO LINEAR SIMPLES	42
FIGURA 15 – PRODUÇÃO DE ETANOL EM FUNÇÃO DO CONSUMO DE GLUCOSE E FRUTOSE NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “D” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS SULFITADO E ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIEDADE <i>bayanus</i> ANALISADO POR REGRESSÃO LINEAR SIMPLES	42
FIGURA 16 – ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “A” UTILIZANDO MOSTO DE UVA SEM PELÍCULAS COM ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIEDADE <i>bayanus</i> NO TEMPO ZERO HORA DE FERMENTAÇÃO.....	48
FIGURA 17 – ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “A” UTILIZANDO MOSTO DE UVA SEM PELÍCULAS COM ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIEDADE <i>bayanus</i> EM 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO.....	48
FIGURA 18 – ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “A” UTILIZANDO MOSTO DE UVA SEM PELÍCULAS COM ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIEDADE <i>bayanus</i> EM 168 HORAS DE FERMENTAÇÃO.....	49
FIGURA 19 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “B” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS E ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIEDADE <i>bayanus</i> NO TEMPO ZERO HORA DE FERMENTAÇÃO.....	50
FIGURA 20 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “B” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS E ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIEDADE <i>bayanus</i> EM 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO.....	51
FIGURA 21 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “B” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS E ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

VARIETADE <i>bayanus</i> EM 168 HORAS DE FERMENTAÇÃO.....	51
FIGURA 22 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “D” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS SULFITADO E ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIETADE <i>bayanus</i> NO TEMPO ZERO HORA DE FERMENTAÇÃO.....	53
FIGURA 23 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “D” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS SULFITADO E ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIETADE <i>bayanus</i> EM 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO.....	53
FIGURA 24 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “D” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS SULFITADO E ADIÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VARIETADE <i>bayanus</i> EM 168 HORAS DE FERMENTAÇÃO.....	54
FIGURA 25 – GRÁFICO DOS ESCORES DE PC1 E PC2 DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZANDO ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DOS PROCESSOS DE MICROVINIFICAÇÃO A, B E D NOS TEMPOS ZERO, 24, 48, 72, 96, 120, 144 E 168 HORAS DE PROCESSO FERMENTATIVO.....	55
FIGURA 26 – GRÁFICO DOS LOADINGS DE PC1 DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZANDO ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DOS PROCESSOS DE MICROVINIFICAÇÃO A, B E D NOS TEMPOS ZERO, 24, 48, 72, 96, 120, 144 E 168 HORAS DE PROCESSO FERMENTATIVO.....	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS (mg/L) DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA NOS PROCESSOS DE MICROVINIFICAÇÃO	46
TABELA 2 – VALORES DE NÚMERO DE ONDA E SEUS RESPECTIVOS GRUPAMENTOS FUNCIONAIS, RELACIONADOS AOS <i>LOADINGS</i> POSITIVOS DO COMPONENTE PRINCIPAL PC1.....	58
TABELA 3 – VALORES DE NÚMERO DE ONDA E SEUS RESPECTIVOS GRUPAMENTOS FUNCIONAIS, RELACIONADOS AOS <i>LOADINGS</i> NEGATIVOS DO COMPONENTE PRINCIPAL PC1.....	59
TABELA 4 – VALORES DE NÚMERO DE ONDA E SEUS RESPECTIVOS GRUPAMENTOS FUNCIONAIS, RELACIONADOS AOS <i>LOADINGS</i> POSITIVOS DO COMPONENTE PRINCIPAL PC2.....	60
TABELA 5 – VALORES DE NÚMERO DE ONDA E SEUS RESPECTIVOS GRUPAMENTOS FUNCIONAIS, RELACIONADOS AOS <i>LOADINGS</i> NEGATIVOS DO COMPONENTE PRINCIPAL PC2.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ADP – Adenosina Difosfato

ATP – Adenosina Trifosfato

C₁₈ – 18 átomos de Carbono

C₆H₁₂O₆ – Octadecil

C₂H₅OH - etanol

CoA – Coenzima A

CO₂ – dióxido de carbono

DAD – Diode Array Detector

mM - milimolar

n. – número

NAD⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida

nm - nanômetro

p/p – peso/peso

p/v – peso/volume

r² – coeficiente de regressão

rpm - rotações por minuto

v/v – volume/volume

RESUMO

O emprego de técnicas analíticas no acompanhamento da fermentação alcoólica auxilia na identificação de problemas durante a fermentação evitando a degradação e perdas de matéria-prima. No presente trabalho foi acompanhada a etapa de fermentação alcoólica de processos de microvinificação empregando uva Cabernet Sauvignon utilizando mosto esterilizado sem e com película e mosto sulfitado. A concentração dos compostos majoritários do vinho, tais como açúcares totais, etanol, ácidos orgânicos e compostos fenólicos, foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados obtidos indicaram que as concentrações de glucose e frutose na produção de etanol apresentaram diferenças significativas entre os processos, no entanto não se verificou diferença significativa na concentração dos compostos fenólicos: epicatequina, ácido cinâmico e quercitina liberados nos processos de microvinificação. Já as concentrações de ácido caféico, ácido p-coumárico e *trans*-resveratrol apresentaram diferenças significativas em decorrência das condições aplicadas a cada um dos processos. A metodologia de espectroscopia na região do infravermelho foi empregada para acompanhar os processos de microvinificação, uma vez que permite avaliar a presença de vários compostos a partir de uma única amostra. Os espectros na região do infravermelho possibilitaram a verificação das diferenças ocorridas durante a fermentação alcoólica nos processos de microvinificação. Os resultados obtidos pela espectroscopia no infravermelho foram analisados por quimiometria, por meio da Análise dos Componentes Principais em decorrência do elevado número de variáveis provenientes dos espectros. Dois componentes principais (PC1 e PC2) foram calculados explicando 92% da variância dos processos. A análise dos dados espectrais com os componentes principais PC1 e PC2 permitiu que fossem sugeridos os grupamentos químicos das substâncias responsáveis pelas diferenças observadas entre os processos.

Palavras-chave: vinificação, fermentação alcoólica, compostos fenólicos, cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopia na região do infravermelho, quimiometria.

ABSTRACT

The use of analytical techniques during alcoholic fermentation helps the correction of problems, avoiding degradation and raw material losses. This work verified the alcoholic fermentation stage from microvinification processes using *Cabernet Sauvignon* grape with and without skin. Variation on the main wine components concentration (total sugar, ethanol, organic acids and phenolic compounds) was analysed by HPLC. The results indicated that glucose and fructose showed significant difference on the ethanol production comparing the different processes. It was not observed significant difference on the phenolic compounds concentration (epicatechin, cinamic acid and quercetin), which are extracted during the microvinification processes. On the other hand, caffeic acid, *p*-coumaric acid and *trans*-resveratrol showed significant differences due to different conditions used in the different processes. Infrared spectroscopy was used in order to evaluate the microvinification processes, once it determines several components in a unique sample. Infrared spectra made possible the checking of differences that occurred during the alcoholic fermentation on the microvinification processes. The results obtained from Infrared spectroscopy were analysed by principal component analysis (PCA), due to the several variable originating from spectra. Two principal components (PC1 and PC2) were calculated, which explains 92% of processes variation. Analysis of spectra data with the principal compounds PC1 and PC2 suggested the functional chemical groups of the compounds responsible by observed differences in the processes.

Key words: vinification, alcoholic fermentation, phenolic compounds, high performance liquid chromatography, infrared spectroscopy, chemometrics.

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento o vinho é a bebida obtida pela fermentação de mosto simples de uva sã, fresca e madura (BRASIL, 1988a). É o resultado de um processo de elaboração complexo, e é dependente de fatores como o solo, a cultivar, o clima, as condições de cultivo e a tecnologia adotada no processo de vinificação (ROBINSON, 1999).

Durante um grande período de tempo, a elaboração de vinho acontecia baseada somente em conhecimentos empíricos, porque a fermentação não era ainda um processo conhecido e dominado pelo homem. Por essa razão, na Idade Média, era comum a adição de mel e especiarias ao vinho para atenuar os defeitos do processo fermentativo (BOURGEOIS, LARPENT, 1995). Apenas no século XIX, Pasteur demonstrou que a fermentação alcoólica é resultado da ação de leveduras sobre os açúcares da uva, sob condições de ausência de oxigênio (HYGINOV, 2000).

Com o avanço da ciência e dos processos tecnológicos, a elaboração de vinho foi aprimorada. A otimização de parâmetros fermentativos, das práticas de cultivo das videiras, do conhecimento da bioquímica e da microbiologia da fermentação, bem como o desenvolvimento de técnicas e materiais para a fermentação e a seleção de leveduras colaboraram para a melhoria da qualidade do vinho (HYGINOV, 2000; ZOECKLEIN et al., 2001).

O Brasil figura no mapa mundial da vitivinicultura, em função não só da quantidade produzida, mas também e principalmente pela qualidade dos seus produtos. O Brasil possui vários pólos de produção de vinhos finos. Desses pólos, quatro estão localizados no Rio Grande do Sul, cuja principal região é a Serra Gaúcha, além das regiões do Alto Médio Uruguai, Serra Sudeste e Campanha, na fronteira com o Uruguai. Além disto, estão se desenvolvendo pólos vinícolas no Planalto Catarinense e no Vale do Rio do Peixe em Santa Catarina e no Nordeste, no vale do São Francisco, divisa dos Estados da Bahia e Pernambuco (SANTOS, 2005).

Em 2006, o Rio Grande do Sul produziu um total de 217,2 milhões de litros de vinho, desses apenas 12% eram vinhos finos e o restante de vinho comum, elaborado a partir de uvas híbridas ou americanas (UVIBRA).

A obtenção de um vinho fino de qualidade envolve desde o produtor, que deverá produzir uvas de melhor qualidade adotando a tecnologia para reduzir custos e aumentar a qualidade de produção, às técnicas de vinificação empregada na elaboração do vinho (GUERRA, TONIETTO, 2003).

No competitivo mercado da produção de vinho há a necessidade de se investir em novas tecnologias objetivando aumentar a produtividade e melhorar a qualidade do vinho produzido. A correção de problemas durante a fermentação como a formação de ácido acético, baixo rendimento de álcool, aromas indesejáveis, substâncias que contribuem para o gosto amargo, parada de fermentação e fermentações lentas e muito demorada requerem um sistema de avaliação dos constituintes do vinho capaz de detectar esses problemas, evitando a degradação e perdas de matéria prima. O controle desses compostos químicos ao longo da fermentação empregando técnicas analíticas é uma valiosa ferramenta para os produtores de vinho, a fim de garantir a qualidade de seus produtos (REDZEPOVIC et al., 2003; ROBINSON, 1999).

As técnicas analíticas são ferramentas importantes para a vinificação. Oficialmente as técnicas de análise de vinho envolvem determinações titulométricas, colorimétricas, gravimétricas, densimétricas e enzimáticas. Entretanto o emprego de metodologias envolvendo a cromatografia líquida de alta eficiência e espectroscopia na região do infravermelho, apesar de não oficiais vem sendo bastante utilizadas na determinação dos compostos majoritários do vinho (BRASIL, 2005; DARIAS-MARTÍN et al., 2003; ROIG, THOMAS, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Acompanhar a fermentação alcoólica em processos de microvinificação empregando uva Cabernet Sauvignon.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- a) Realizar processos de microvinificação utilizando mosto de uva esterilizado sem e com película e mosto de uva sulfitado;
- b) Avaliar a degradação dos principais açúcares e a formação de etanol do mosto da uva Cabernet Sauvignon utilizando cromatografia líquida de alta eficiência;
- c) Acompanhar a formação dos principais compostos voláteis e compostos secundários da fermentação alcoólica do vinho Cabernet Sauvignon utilizando cromatografia líquida de alta eficiência;
- d) Avaliar a evolução do pH no processo de vinificação em tintos;
- e) Acompanhar os processos de microvinificação por espectroscopia na região do infravermelho para fornecer perfis de alterações dos constituintes durante os processos fermentativos;
- f) Analisar o perfil espectral das amostras em estudo a partir dos espectros no infravermelho por técnica quimiométrica (análise dos componentes principais).

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 UVA

A uva, fruto da videira é a matéria prima da indústria vinícola. É formada por uma porção lenhosa ramificada, a ráquis ou engaço, e a porção carnuda, denominada baga ou grão. O grão é formado pela película ou casca, polpa e semente. As proporções relativas de cada uma destas partes são variáveis, não somente em função da variedade da uva, mas também segundo as práticas de cultivo, as condições climáticas, o tipo de solo e a ocorrência de pragas e doenças (PATO, 1978).

A ráquis representa 3 a 7% do peso do cacho e contém de 1 a 3% de taninos. Nas uvas maduras apresenta-se lignificado e com coloração castanha (VOGT, 1984).

A polpa é constituída principalmente de água (70 a 80% do volume total), açúcares na forma de glucose e frutose, taninos, materiais corantes, ácidos orgânicos como os ácidos tartárico, málico e cítrico, substâncias minerais, destacando-se o potássio, o magnésio, o ferro, o cálcio e fosfatos, além de compostos nitrogenados e substâncias pécticas (PATO, 1978).

Na película estão presentes substâncias aromáticas e, principalmente, as corantes, que são de extrema importância para elaboração de vinhos tintos. Como esses pigmentos são liberados somente com o rompimento das células, a vinificação dos vinhos tintos realiza-se na presença das películas (VOGT, 1984). Além das matérias corantes e substâncias aromáticas, a película contém minerais, substâncias nitrogenadas e taninos (CHOCIAI et al., 2000).

As sementes representam 3 a 4% do peso do grão, e contém 10 a 20% de óleo e 5 a 9% de taninos, além de pequenas quantidades de ácidos voláteis (VOGT, 1984). Nas vinificações, deve-se evitar o esmagamento das sementes, pois pode ocorrer a liberação de taninos, óleos e ácidos orgânicos que prejudicam a qualidade do vinho atribuindo gosto amargo (CHOCIAI et al., 2000).

A uva Cabernet Sauvignon, originária da região de Bordeaux, França, é uma cultivar de brotação e maturação tardia e de elevada qualidade de vinificação. É uma das cultivares de uva tinta mais difundida no mundo. É uma

cultivar bem adaptada à região da Serra Gaúcha, apresentando teores de açúcar e acidez adequados à vinificação. O vinho Cabernet Sauvignon se caracteriza por apresentar coloração e aroma marcantes (RIZZON, MIELE, 2002a; ROBINSON, 1999).

Os fatores naturais, como o solo e o clima, influenciam a composição da uva e conseqüentemente a qualidade do vinho. O solo tem influência direta sobre o desenvolvimento das plantas afetando a retenção de umidade, a disponibilidade de nutrientes, a capacidade de refletir luz e calor e no crescimento das raízes como resultado da facilidade de penetração. Já as condições climáticas, como a intensidade de luz solar e o calor, afetam a fisiologia da videira e da uva por meio de respostas fotossintéticas e térmicas (ZOECKLEN et al., 2001). O clima quente e seco favorece o desenvolvimento dos cachos originando grãos grandes e mosto com elevado teor de açúcares e com baixa acidez. Nos climas frios, o mosto apresenta baixo teor de açúcar e elevada acidez (CATALUÑA, 1984).

As regiões mais favoráveis para a produção de vinho são aquelas compreendidas entre os paralelos 30° e 50°, nas zonas de clima temperado. A viticultura brasileira está fora dessas latitudes e suas características climáticas são particulares e distintas daquelas encontradas na maioria dos países vinícolas. A Serra Gaúcha é cortada pelo paralelo 29° com altitudes variando de 600 a 1000 metros, os vinhedos são plantados em terrenos normalmente ondulados e na composição do solo predomina argila compactada. Quanto ao clima, há umidade excessiva de umidade principalmente no período de maturação da uva (GUERRA, TONETTO, 2003; SANTOS, 2005).

3.2 LEVEDURA

As leveduras são microrganismos que estão amplamente distribuídas na natureza. São fungos unicelulares, não filamentosos, geralmente esféricos, ovais ou cilíndricos. As células de levedura são maiores que as células bacterianas, podendo ser distinguidas microscopicamente das bactérias por suas dimensões e pela evidente presença de estruturas celulares internas, tal como núcleo. A divisão celular geralmente ocorre por brotamento, mas existem leveduras que se multiplicam por fissão binária. Nas leveduras de brotamento,

como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a célula parental forma uma protuberância, denominada broto, na sua superfície externa. Devido as suas características celulares e à rápida multiplicação elas são frequentemente utilizadas como modelo para estudos com organismos eucarióticos. (HANSEN, KIELLAND-BRANDT, 1996; TORTORA, FUNKE, CASE, 2005).

Os fungos são organismos quimiorganotróficos, que geralmente apresentam exigências nutricionais simples. As leveduras são capazes de crescimento anaeróbico facultativo e por isso têm muitas aplicações nas indústrias alimentícias e na produção de bebidas. Elas podem utilizar oxigênio ou um componente orgânico como aceptor final de elétrons. Se for dado acesso ao oxigênio, as leveduras respiram aerobicamente para metabolizar hidratos de carbono formando dióxido de carbono e água. Na ausência de oxigênio, elas fermentam os hidratos de carbono, produzindo etanol e dióxido de carbono (NOVO et al., 2003; TORTORA, FUNKE, CASE, 2005).

A levedura *Saccharommyces*, é de grande interesse para a indústria de fermentação devido a uma combinação de várias propriedades como o crescimento rápido, eficiente utilização da glucose, capacidade de produzir e consumir etanol e por apresentar tolerância a estresses ambientais como elevadas concentrações de etanol e baixos níveis de oxigênio (PISKUR et al., 2006).

Segundo Fleet (2003) as leveduras contribuem para a formação de características sensoriais do vinho por mecanismos como: atuam na qualidade da uva antes da colheita por realizarem um biocontrole contra fungos; conduzem a fermentação alcoólica; adsorvem componentes do mosto e influenciam no crescimento de bactérias lácticas.

Quanto à composição química, as leveduras são constituídas aproximadamente de 68 a 83% de água, substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais. A parede celular das leveduras é geralmente composta por 80 a 90% de polissacarídeos com proteínas, lipídios, polifosfatos e íons inorgânicos (MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2004).

3.3 ELABORAÇÃO DO VINHO TINTO

A cultivar Cabernet Sauvignon apresenta uma elevada capacidade de adaptação em muitas regiões vitícolas mundiais. O seu vinho é reputado pelo caráter varietal, sua intensa coloração, riqueza em taninos e complexidade de aroma e buquê. Evolui com o envelhecimento atingindo sua máxima qualidade desde dois a três anos até cerca de vinte anos (CAMARGO, 2003).

A vinificação é o conjunto de operações necessárias para a elaboração de vinhos. De um modo geral a elaboração de vinho segue processos tradicionais com variações dependendo do tipo de vinho desejado (CHRISTAKI, TZIA, 2002). O processo de produção de vinho tinto difere do protocolo praticado para a elaboração de vinhos brancos. As antocianinas da película das uvas tintas são responsáveis pela coloração vermelha desses vinhos, por esse motivo a vinificação em tinto é realizada na presença das películas. Além da matéria corante a película possui quantidades elevadas de outros compostos fenólicos desejáveis na composição do vinho. No entanto, a extração em excesso desses compostos não é apreciada em vinhos brancos, caracterizados por serem vinhos mais leves (ROBINSON, 1999; VOGT, 1984).

De maneira geral, a elaboração de vinhos tintos segue as seguintes etapas:

3.3.1 Maturação e Colheita

A elaboração do vinho inicia-se ainda na videira como o controle do amadurecimento da uva, para a determinação do melhor momento para a colheita. A maturação da uva é resultado de uma série de transformações bioquímicas, que pode ser dividida em três fases:

Uma primeira fase de crescimento rápido ou herbáceo, cuja duração varia entre 45 e 65 dias dependendo da cultivar da videira e das condições do meio. Neste primeiro período a clorofila é o pigmento predominante, os grãos apresentam uma atividade metabólica intensa caracterizada por uma acentuada atividade respiratória e uma rápida acumulação de ácidos. Uma fase de diminuição de crescimento que se caracteriza pela aparição de cor nas castas tintas e película translúcidas nas castas brancas. A mudança de cor vem acompanhada de mudanças físicas no grão, o qual se torna túrgido,

adquirindo certa elasticidade e maciez a medida que a maturação avança (DUBOURDIEU, DONECHE, LONVAUD, 2003; GUERRA, 2003a).

Uma segunda fase de crescimento correspondente a maturação propriamente dita. O crescimento celular se reinicia acompanhado de diversas modificações fisiológicas. Este último período dura de 35 a 55 dias, durante os quais a uva acumula açúcares, potássio, aminoácidos e compostos fenólicos enquanto os teores de ácidos diminuem (DUBOURDIEU, DONECHE, LONVAUD, 2003). Na maturação o açúcar produzido é continuamente consumido pelas células vegetais, pelos processos bioquímicos de respiração celular. Durante todo o processo o açúcar apresenta uma curva ascendente de produção até atingir um patamar, que corresponde a maturação completa. Depois disso as concentrações de açúcar começam a baixar, pois cessa a produção, mas o consumo celular continua. A acidez decresce durante a maturação principalmente devido ao processo de respiração do ácido málico, à diluição dos ácidos orgânicos em função do aumento do tamanho do grão e a salificação pela presença de potássio, cálcio e magnésio. Nesta época o ideal é bastante calor e ausência de chuva (GUERRA, 2003a; RIZZON, MIELE, 2002b).

O início e período de maturação permitem classificar as cultivares de uvas em classes de maturação precoce, média ou tardia. Porém essa não é uma classificação fixa, uma vez que as condições climáticas exercem influências sobre a maturação da uva. A Cabernet Sauvignon é uma cultivar de brotação e maturação tardia (RIZZON, MIELE, 2002a).

A uva destinada à produção de vinho é colhida segundo diferentes critérios, em função do país ou da região de produção, do tipo de vinho a ser elaborado e das condições naturais predominantes em determinada safra. A colheita envolve acompanhamento dos teores de açúcares e acidez da uva a fim de determinar o melhor momento para a colheita. A uva de qualidade enológica deve apresentar por ocasião da colheita equilíbrio entre as concentrações de ácido málico e ácido tartárico. A razão pela qual se estabelece critérios para a determinação do ponto ideal da colheita baseia-se no fato da qualidade da uva ser determinante para a qualidade do vinho. É importante realizar a colheita em tempo seco, pois a chuva causa redução no teor de açúcar e elevação dos níveis de acidez (GUERRA, 2003a; ROBBINSON, 1999; VOGT, 1984).

3.3.2 Separação da Ráquis e Esmagamento

Após a colheita, a uva é classificada e separada por variedade, e com o auxílio de uma máquina é separada da ráquis e esmagada provocando a ruptura da casca e a liberação do mosto. O processo deve ocorrer sem triturar as sementes para evitar o aparecimento de gosto amargo no vinho (SANTOS, 2005).

Para obtenção de vinhos límpidos e com sabor fresco, os cachos devem ser esmagados e desengaçados no mesmo dia da colheita para evitar uma fermentação prematura do mosto e a solubilização precoce de taninos e outras substâncias pelo álcool formado e a proliferação bacteriana pela exposição ao ar e ao calor (VOGT, 1984).

3.3.3 Correções e Aditivos

Segundo a Portaria n. 229 de 1988, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para melhorar os constituintes naturais do vinho, podem-se efetuar correções no mosto. São consideradas práticas enológicas lícitas: a adição de ácido tartárico, metatartárico, cítrico, láctico. Ascórbico (e seus sais), sórbico (e seus sais), carbonato carbônico, dióxido de enxofre (e seus sais), carbonato de cálcio, tartarato neutro de potássio e carbonato de potássio. Além disso, é permitido a adição de açúcar na forma de sacarose, prática conhecida como chaptalização (BRASIL, 1988b).

Outra prática comum e indispensável é a sulfitagem do mosto, que deve ser realizada antes da adição de leveduras. Na sulfitagem adiciona-se dióxido de enxofre na forma de metabissulfito de potássio, com objetivo de impedir a oxidação e bloquear a ação de bactérias. Quando adicionado durante o esmagamento da uva, o metabissulfito inibe a atividade de certos microrganismos nocivos e permite que a fermentação se realize somente pela ação de certas espécies de leveduras (CATALUÑA, 1984). Porém, quando empregada em doses muito elevadas além de prejudicial à saúde, pode retardar ou impedir a fermentação alcoólica e malolática (CHOCIAI et al., 2000).

3.3.4 Adição das Leveduras

A adição de leveduras selecionadas secas ativas assegura um início rápido da fermentação, uniformidade nas características aromáticas, completa utilização dos açúcares fermentáveis e menor formação de ácido acético e acetaldeído, além de reduzir o tempo de fermentação (DORNELES, 2003).

Uma fermentação alcoólica espontânea, sem a adição de leveduras comerciais, é normalmente conduzida por uma sucessão de diferentes leveduras e também com a participação de bactérias, o que conduz a um início lento da fermentação. A população de leveduras presentes no estágio inicial da fermentação, inclui espécies de *Kloeckera*, *Metschinkowia*, *Candida*, *Hanseniaspora* e *Saccharomyces* (COCOLIN, BISSON, MILLS, 2000). As espécies não-*Saccharomyces* apresentam crescimento no início da fermentação, antes da dominação das espécies *Saccharomyces* devido a sua menor tolerância a elevados níveis de etanol quando comparadas às outras espécies. Entretanto, embora essas leveduras participem apenas do início da fermentação, elas produzem compostos de aroma que tem grande contribuição para a qualidade sensorial do vinho (MAMEDE, PASTORE, 2004).

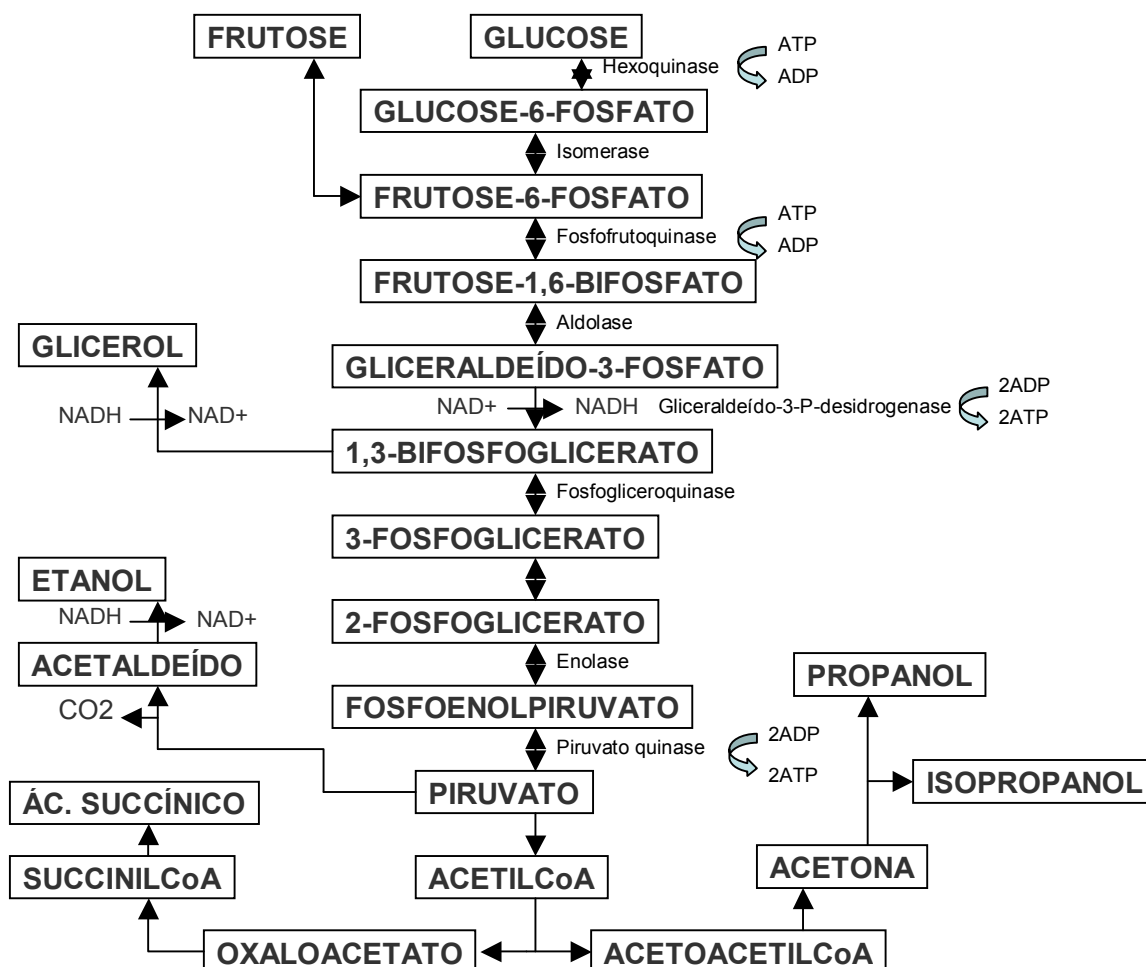
3.3.5 Processo de Fermentação Vínica

O processo fermentativo inicia-se com uma primeira fermentação, a fermentação alcoólica, pela qual os açúcares do mosto são transformados em álcool com liberação de dióxido de carbono. A via bioquímica de fermentação da glucose corresponde a glicólise, também denominada via de Embden-Meyerhof. A glicólise pode ser dividida em três estágios principais, cada um envolvendo uma série de reações enzimáticas individualmente catalisadas. O primeiro estágio envolve uma série de rearranjos preparatórios com reações que não envolvem oxidação e redução e não liberam energia. No segundo e terceiro estágio ocorrem reações de oxidação e redução, com geração de energia e formação dos produtos de fermentação. Dessa maneira, em uma fermentação alcoólica pode se distinguir três fases, mesmo que não seja possível estabelecer com nitidez os limites de separação entre elas (MADIGAN, MARTINKO, PAKER, 2004; LIMA et al., 2001).

A fase preliminar, fase lag ou lag-fase, inicia-se no momento de contato das leveduras com o mosto. Durante os primeiros dias de fermentação o metabolismo da levedura está direcionado para divisão e crescimento celular, a população cresce atingindo concentrações de 10^8 a 10^9 células por mililitro de mosto. Nesta fase o metabolismo envolve a biossíntese de aminoácidos, ácidos nucléicos, polissacarídeos e lipídios, gerando uma necessidade de energia na forma de ATP e NADH para essas reações de sínteses. Essa energia é conseguida pela metabolização dos açúcares do mosto pela via glicolítica. Portanto quando a levedura é inoculada no mosto, o etanol não é formado imediatamente, apenas uma pequena porção de piruvato e NADH formados com a glicólise é disponibilizada para descarboxilação a acetaldeído e redução a etanol. Nessa fase ocorre elevação da temperatura e desprendimento de dióxido de carbono (MORENO-ARRIBAS, POLO, 2005; PRETORIUS, 2004).

Neste primeiro estágio a glucose é fosforilada pela ação de uma hexoquinase, originando a glucose 6-fosfato, que é então convertida por uma isomerase a frutose 6-fosfato (FIGURA 1). Se outras hexoses diferentes da glucose forem fermentadas pela via glicolítica, elas são convertidas em frutose 6-fosfato. Ocorre então uma segunda fosforilação que leva a produção de frutose 1,6-bifosfato. Em seguida a enzima aldolase cliva a frutose 1,6-bifosfato em duas moléculas contendo três carbonos, o gliceraldeído 3-fosfato e seu isômero a diidroxiacetona fosfato. Uma reação de oxi-redução ocorre com a conversão do gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato, pela enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase com formação de NADH. A fosforilação da molécula ocorre pela adição de um fosfato inorgânico. Essa reação, de fosforilação a nível de substrato, propicia as condições de conservação de energia e formação de ATP. O 3-fosfoglicerato resultante da desfosforilação, é convertido a 2-fosfoglicerato pela transferência enzimática do fosfato remanescente. A molécula de 2-fosfoglicerato é convertida em fosfoenolpiruvato pela ação da enzima enolase, neste processo a ligação fosfato é elevada a uma ligação de alta energia. A enzima piruvato quinase é responsável pela reação de conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato, que também resulta na formação de ATP (MADIGAN, MARTINKO, PAKER, 2004; TORTORA, FUNKE, CASE, 2005).

FIGURA 1 – VIA DA METABOLIZAÇÃO DOS AÇÚCARES PELA LEVEDURA.



A fase tumultuosa é a fase de maior tempo de duração. A temperatura eleva-se com rapidez, a densidade do mosto reduz e os teores de álcool e acidez aumentam. A redução de acetaldeído a etanol promove um aumento da demanda de energia na forma de NADH. Esse aumento na necessidade de energia é compensado com a oxidação do acetaldeído a ácido acético, a energia gerada com essa oxidação também é utilizada para o crescimento celular. Entretanto no decorrer do processo, com a contínua elevação dos níveis de etanol, a taxa de crescimento celular diminui igualando-se a taxa de morte celular, gerando o que se chama de fase estacionária. Nesta fase, aproximadamente metade do açúcar disponível no meio foi consumida pela levedura e o teor de álcool é em torno de 15% (JOSHI, PANDEY, 1999; LIMA

et al., 2001; SANTOS, 2005). Essa fase caracteriza-se também pelo desprendimento volumoso e intenso de dióxido de carbono. O dióxido de carbono faz com que as partes sólidas do mosto subam e fiquem flutuando na superfície, constituindo o chamado 'chapéu'. O líquido próximo ao chapéu adquire cor, devido a liberação da matéria corante da película. Para favorecer a extração dos compostos da película e homogeneizar o mosto em fermentação recomenda-se efetuar as remontagens, que consiste em retirar o mosto da parte inferior do recipiente e coloca-lo parte de cima da porção sólida da uva.

Durante a fermentação as leveduras produzem em menor concentração vários compostos voláteis derivados dos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos a partir do piruvato. Esses compostos voláteis são álcoois superiores, aldeídos e ésteres (MORENO-ARRIBAS, POLO, 2005).

A fase complementar caracteriza-se pela diminuição do volume de dióxido de carbono desprendido, menor agitação no mosto e diminuição da temperatura. Nessa fase a fermentação diminui e a população de leveduras cai para 10^4 a 10^5 células por mililitro de mosto, e conseqüentemente diminui a demanda energética. O acetaldeído é reduzido a etanol gerando NAD^+ para manutenção da glicólise. A glicólise é importante para fornecer ATP necessário para a manutenção da função celular. Outra fonte alternativa para regeneração de NAD^+ é a conversão de fosfogliceraldeído a glicerol (JOSHI, PANDEY, 1999).

No fim da fermentação uma pequena porção dos açúcares, frutose em maior quantidade que a glucose, permanecem no meio (PRETORIUS, 2004).

A maceração ocorre simultaneamente com a fermentação alcoólica, até o momento da descuba, quando as partes sólidas são retiradas do contato com o suco de uva fermentado (SANTOS, 2005). A maceração é a fase de permanência da película em contato com o mosto, para que nele se dissolvam os corantes e se definam o sabor e aroma do vinho. Os vinhos tintos são vinho de maceração, que é responsável pelas características específicas, visuais, olfativas e gustativas que os diferenciam dos vinhos brancos (DUBOURDIEU, DONECHE, LONVAUD, 2003).

A descuba pode ser realizada antes do fim da fermentação alcoólica quando se deseja atenuar o caráter tânico do vinho, dando origem a um vinho mais açucarado e suave, para ser consumido jovem, ou vários dias após o

término da fermentação em vinhos de guarda, para permitir que o vinho atinja conteúdo tânico necessário para sua evolução. No entanto, o melhor momento para a descuba é logo após o término da fermentação alcoólica, desta maneira é possível obter o máximo de extração de matéria corante com uma taxa moderada de taninos (DUBOURDIEU, DONECHE, LONVAUD, 2003).

Os vinhos tintos sofrem uma segunda fermentação após a fermentação alcoólica, por influência do calor e de bactérias láticas. Além de tornar o vinho mais estável, esse processo contribui para que seu sabor seja mais macio e mais complexo (ROBINSON, 1999). A fermentação malolática é um fator de qualidade para grande parte dos vinhos tintos, enquanto que para os brancos, pode ser considerada muitas vezes negativa, uma vez que tende a reduzir o sabor frutado e o frescor desses vinhos (BENASSI, 1997).

A fermentação malolática consiste na transformação bacteriana do ácido málico presente no vinho, em ácido lático e dióxido de carbono. As bactérias responsáveis por essa biotransformação são geralmente associadas a três gêneros: *Oenococcus*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*. Além da desacidificação natural do vinho a fermentação malolática melhora a estabilidade biológica dos vinhos impedindo a utilização do ácido málico por outras espécies, uma vez que diferentes gêneros de bactérias podem exercer diferentes efeitos sobre a composição do vinho (MAICAS et al., 1999b).

3.4 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO VINHO

O vinho possui compostos biologicamente ativos que podem apresentar propriedades preventivas contra algumas doenças. Estudos epidemiológicos têm sugerido que o consumo de vinho, em especial o vinho tinto, pode apresentar efeito protetor contra o desenvolvimento de doenças coronarianas isquêmicas. Além disso, existem outros benefícios atribuídos ao vinho, como ação anti-séptica, antivirótica e prevenção do câncer (TORRES, 2002).

O vinho tinto possui um grande número de constituintes polifenólicos, como flavonóides, estilbenos, antocianinas, ácidos fenólicos e taninos, que exercem efeitos sobre a saúde humana (GAMBELLI, SANTORINI, 2004).

Na França, apesar da alimentação rica com gordura saturada a incidência de doença coronariana é baixa quando comparada a outros países

industrializados, esse fato é conhecido como “Paradoxo Francês”, segundo Renauld e De Lorgeril (1992) a redução do risco de doença coronariana pode ser atribuído ao consumo regular de vinho em quantidades moderadas.

Estudos realizados por Hollman, Hertog e Katan (1996) relacionam o aumento do consumo de polifenóis com a redução do risco de doenças cardíacas, evidenciando a ação antioxidante e efeitos na redução da trombose.

Os compostos fenólicos presentes no vinho apresentam capacidade de inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana *in vitro*, além de exercer ação sobre alguns sistemas enzimáticos como no caso das peroxidases e lipoxigenases (FRANKEL et al., 1993).

Além dos compostos fenólicos, o álcool presente no vinho, quando consumido em quantidades moderadas, atua sobre o metabolismo lipídico aumentando as lipoproteínas de alta densidade (HDL), captando o colesterol livre das células periféricas. O álcool também possui efeito vasodilatador e inibe a agregação plaquetária responsável pela obstrução dos vasos sanguíneos (RENAULD, DE LORGERIL, 1992).

O *trans*-resveratrol presente no vinho também contribui com os efeitos antioxidantes. Jang e colaboradores (1997) demonstraram a atividade antioxidante e antimutagênica desse estilbeno. O *trans*-resveratrol também apresentou atividade antiinflamatória com a inibição da cicloxigenase e da hidroperoxidase. Lee e Rennaker (2007) avaliaram a capacidade antioxidante em 42 vinhos, sendo 12 Cabernet Sauvignon determinando o conteúdo desse estilbeno.

3.5 COMPONENTES QUÍMICOS DO MOSTO E DO VINHO

As análises laboratoriais são ferramentas importantes para garantir a qualidade do vinho. A partir dessas determinações analíticas são estabelecidos padrões de qualidade e os limites legais das substâncias presentes no vinho.

3.5.1 Açúcares Totais

Os açúcares predominantes na uva são a glucose e a frutose, representando cerca de 99% dos carboidratos no mosto, e por 12 a 27% do peso das uvas maduras. No início da maturação, a glucose predomina amplamente, mas à medida que a maturação avança a relação glucose/frutose diminui, chegando a um ponto em que os teores dos dois açúcares se equivalem (DAUDT, SIMON, 2001; GUERRA, 2003a). Na fermentação alcoólica as leveduras utilizam a glucose e frutose como fonte energia, no entanto apesar da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizar concomitantemente os dois açúcares, há uma preferência pela glucose, o que gera ao final da fermentação um residual de frutose. Essa porção residual de frutose tem importância especial na produção de vinhos leves e frisantes, ou ainda para vinhos suaves sem adição de açúcares (BERTHELIS et al., 2004; DAUDT, SIMON, 2001).

A uva contém ainda uma pequena quantidade de açúcares não fermentescíveis, cerca de um grama por litro, e que se encontram no vinho. Esses açúcares são as pentoses, das quais as principais são a arabinose e a xilose. Por causa desses açúcares, jamais a dosagem de açúcares redutores é zero. O teor de açúcares da uva varia em função de fatores como o estágio de maturação, o clima, o solo e a variedade da uva (AQUARONE et al., 2001; ZOECKLEIN et al., 2001).

3.5.2 Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos presentes no vinho são importantes por exercerem influência nas propriedades organolépticas de cor, aroma e sabor, e também por atuarem na estabilidade e no controle microbiológico. Esses ácidos orgânicos podem ser originados da própria uva, ou durante o processo de fermentação. A análise desses compostos permite o acompanhamento da maturação da uva e o controle da evolução da acidez do vinho durante os diferentes estágios do processo de vinificação (MATO, SUÁREZ-LUQUE, HUIDOBRO, 2005).

Na uva, o ácido tartárico e o ácido málico são os ácidos predominantes, enquanto o ácido cítrico está presente em menor proporção. Eles representam os principais ácidos do vinho. O ácido tartárico é responsável pela regulação da acidez do vinho e durante o processo de fermentação tem sua concentração diminuída pela precipitação sob a forma de cristais de bitartarato de potássio e tartarato de cálcio. A concentração de ácido málico também diminui durante a vinificação, ele pode ser transformado em etanol durante a fermentação malolática. Esses ácidos juntamente com o ácido cítrico estão relacionados com a acidez fixa do vinho (BENASSI, 1997; REDZEPOVIC et al, 2003; ZOTOU, LOUKOU, KARAVA, 2004).

Os ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação são representados principalmente pelo ácido acético, ácido láctico e ácido succínico. O ácido acético é o principal constituinte de acidez volátil. É originado do acetaldeído e sua presença é comum em baixas concentrações no vinho. Traços de ácido succínico são encontrados em todos os vinhos e sua presença esta relacionada com o enriquecimento no sabor do vinho durante o envelhecimento (ZOECKLEIN et al., 2001; ZOTOU, LOUKOU, KARAVA, 2004).

Uma medida importante do vinho que deriva principalmente dos ácidos é o pH. O conhecimento do pH é de suma importância, visto que por ele se avalia a resistência do vinho às enfermidades. Vinhos com pH superior a 3,5 não apresentam-se em condições de conservação por permitirem a evolução de uma flora microbiana prejudicial (DORNELES, 2003).

3.5.3 Álcoois

O conteúdo alcoólico de um vinho influi na sua estabilidade, assim como em suas propriedades sensoriais, os álcoois são responsáveis por determinar o corpo do vinho e influenciar no sabor. Dos álcoois produzidos durante a fermentação o etanol é o de maior importância para o vinho, porém não é o único, uma infinidade de outros compostos produzidos também contribui significativamente nas propriedades sensoriais do vinho, dentre os álcoois presentes no vinho também se destacam o glicerol, alguns álcoois superiores e o metanol (VALERO et al., 2002; ZOECKLEIN et al., 2001).

A produção de etanol pelas leveduras vínicas é subordinada ao teor de oxigênio disponível no meio e a disponibilidade de açúcares que deve ser superior a 4-5% para induzir os sistemas da piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase. Contudo a maioria das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* é inibida quando a concentração de álcool do meio se aproxima de 14 a 15% (DORNELES, 2003).

O glicerol é um subproduto da fermentação alcoólica, é produzido e acumulado pela levedura em resposta ao estresse osmótico do meio. Por suas características químicas que contribuem com o corpo e as propriedades sensoriais do vinho, o glicerol é um produto desejável no vinho (YALÇIN, OZBAS, 2004).

O metanol é um produto tóxico para a saúde, bebidas alcoólicas como vinho, cervejas e destilados contêm pequenas concentrações de metanol. Segundo Cordonnier (1987), Ough e Amerine (1988) e Ribéreau-Gayon e colaboradores (2000) citados por Cabaroğlu (2005) o metanol presente no vinho é formado pela degradação enzimática de substâncias pécicas, presentes naturalmente nas uvas esmagadas, por pectinesterases.

A produção de metanol no vinho é dependente de fatores como a casta da uva, a sanidade da uva, a maceração, a temperatura de fermentação e a adição de enzimas pectinolíticas ao mosto para a extração de cor e clarificação (CABAROĞLU, 2005; REVILLA, GONZALES-SANJOSE, 1998).

3.5.4 Compostos Fenólicos

A uva e o vinho contém uma grande variedade de compostos fenólicos que são especialmente importantes, pois conferem aos vinhos a coloração, grande parte do sabor, contribuem para o perfil olfativo, além de possuir propriedades bactericidas e antioxidantes. As diferenças entre os tipos de vinho resultam, na maioria das vezes, das diferenças de concentração e composição desses compostos (CASTELLARI et al., 2002; GLORIES, DUBOURDIEU, MAUJEAN, 2003).

Os compostos fenólicos podem ser formados na uva através de duas vias metabólicas: a via do ácido chiquímico a partir de carboidratos, ou pela via do acetato-polimalato, que inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. A

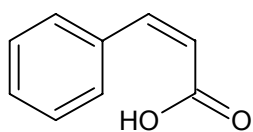
maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre, mas sob a forma de ésteres ou heterosídeos sendo, portanto solúveis em água e em solventes orgânicos polares (SIMÕES et al., 2000).

A concentração desses compostos na uva e no vinho depende de fatores como a cultivar de videira, as condições de cultivo, estágio de maturação e os métodos de vinificação empregados. Além disso, a composição fenólica do vinho pode variar durante todo o processo de vinificação, estabilização e armazenamento do vinho devido às reações que ocorrem durante o envelhecimento, como as reações de condensação, polimerização, oxidação e precipitação (COZZOLINO et al., 2004; GONZALEZ-NEVES et al., 2004).

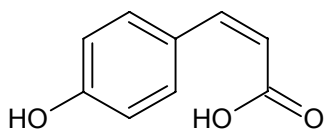
Os compostos fenólicos são encontrados principalmente nos vacúolos das películas da uva, mas podem também estar presentes na polpa e nas sementes, eles são acumulados na uva durante a maturação e são extraídos durante a maceração, no decorrer do processo de vinificação pela presença de etanol (CASTELLARI et al., 2002; GLORIES, DUBOURDIEU, MAUJEAN, 2003).

O vinho tinto em especial é uma excelente fonte de polifenóis com diferentes atividades biológicas, sendo os principais os ácidos fenólicos, antocianinas, taninos e flavonóides.

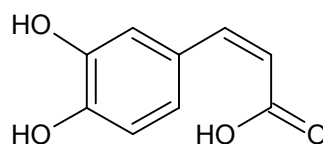
FIGURA 2 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÁCIDOS FENÓLICOS: ÁCIDO CINÂMICO, ÁCIDO p-COUMÁRICO E ÁCIDO CAFÉICO.



Ácido Cinâmico



Ácido p-Coumárico

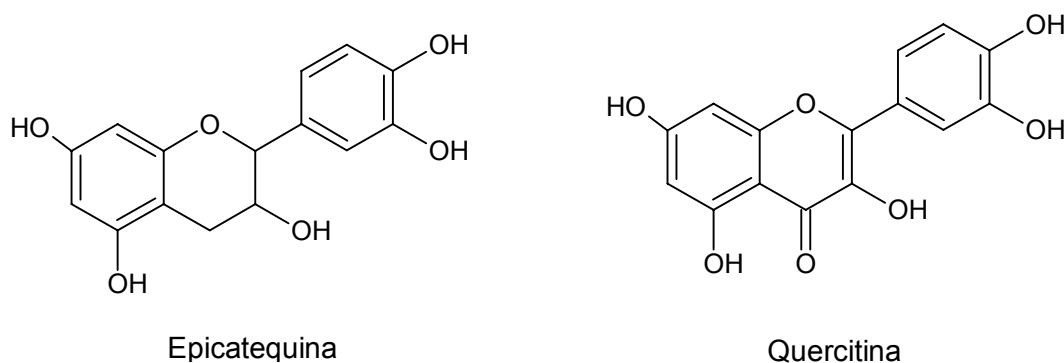


Ácido Caféico

Os ácidos fenólicos são incolores quando em solução hidro-alcoólica, mas adquirem uma cor amarelada quando oxidados. Os ácidos fenólicos incluem os ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos mais comuns em alimentos são os ácidos gálico e elágico. Os ácidos

hidroxicinâmicos mais comuns presentes em alimentos são os ácidos caféico, felúrico e coumárico. Esses compostos não apresentam um sabor ou odor característico, porém são precursores de compostos fenólicos voláteis através da ação de microrganismos (GIL-MUÑOZ et al., 1999; GLORIES, DUBOURDIEU, MAUJEAN, 2003).

FIGURA 3 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS FLAVANÓIDES EPICATEQUINA E QUERCITINA.

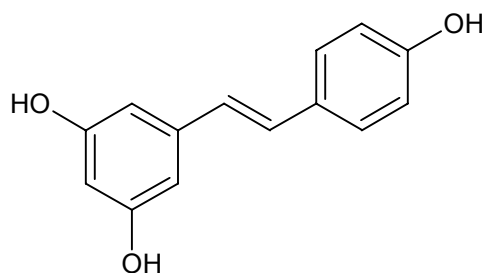


Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular que normalmente ocorrem como glicosídeos, e são agrupados em antocianinas e antoxantinas. As antocianinas são moléculas de pigmentos vermelhos, azuis e púrpura. As antoxantinas incluem os flavonóis e flavonas, são moléculas pouco coloridas ou de coloração branca ou amarela. A quercetina é um dos flavanóides mais freqüentes em alimentos. Esses compostos estão diretamente relacionados com a coloração do vinho. Os taninos são compostos de alto peso molecular e são divididos em dois grandes grupos: os hidrolisáveis e os condensados. Os taninos presentes principalmente nas sementes, mas também encontrados nas películas são responsáveis por proporcionar a adstringência do vinho uma vez que são capazes de se complexar com proteínas e outras moléculas. Os taninos hidrolisáveis são polímeros de ácido gálico e ácido elágico, já os taninos condensados são polímeros de catequinas ou epicatequinas (GLORIES, DUBOURDIEU, MAUJEAN, 2003; KING, YOUNG, 1999).

O trans-resveratrol é um polifenol complexo presente na uva e no vinho. É sintetizado nas películas da uva em resposta ao estresse causado por ataque fúngico e é extraído durante a vinificação. Esse estilbeno tem reconhecidas

atividades biológicas destacando-se ação antiinflamatória, inibição da enzima lipoxigenase e ação anticarcinogênica *invitro* (GAMBELLI, SANTARONI, 2004; GLORIES, DUBOURDIEU, MAUJEAN, 2003).

FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO *trans*-RESVERATROL.



3.6 METODOLOGIAS EM ANÁLISE DE VINHO

As técnicas analíticas são ferramentas importantes para a vinificação. Muitas vezes os resultados obtidos diferem dependendo da técnica adotada. Oficialmente as técnicas de análise de vinho envolvem determinações titulométricas, colorimétricas, gravimétricas, densimétricas e enzimáticas (BRASIL, 2005; DARIAS-MARTÍN et al., 2003). Entretanto o emprego de metodologias como a cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa, espectroscopia no infravermelho, ressonância nuclear magnética, entre outras, apesar de não oficiais são bastante utilizadas na determinação dos compostos majoritários do mosto e do vinho (LUQUE-DE-CASTRO, GONZALEZ-RODRIGUEZ, PEREZ-JUAN, 2005; MATO, SUÁREZ-LUQUE, HUIDOBRO, 2005; ROIG, THOMAS, 2003).

3.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os métodos cromatográficos permitem a separação, identificação e quantificação de compostos químicos.

A cromatografia líquida de alta eficiência é um tipo de cromatografia que emprega pequenas colunas preenchidas de materiais especialmente preparados (fase estacionária) e uma fase móvel que é eluída sob alta pressão. Uma pequena porção da amostra é injetada no sistema e elui juntamente com a fase móvel pela coluna de separação. Interações físicas e químicas que ocorrem entre os componentes da amostra e a fase estacionária retardam a passagem da amostra pela coluna. O tempo gasto pela amostra para a completa passagem pela coluna é denominado tempo de retenção e é característico para cada composto. O tempo de retenção de um componente depende da sua natureza e da composição da fase móvel e da fase estacionária. No cromatograma, a concentração de um composto está relacionada com a área do pico que aparece assim que ele sai da coluna, ou seja, no seu tempo de retenção (BELTRÁN et al., 2006; COLLINS, BRAGA, BONATO, 1997; REVILLA et al., 2001).

A cromatografia líquida de alta eficiência tem capacidade de realizar separações e análises de quantificação de uma grande quantidade de compostos presentes em uma amostra, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Em alguns casos, dependendo da composição da amostra, há a necessidade de um pré-tratamento da amostra para assegurar uma boa separação dos compostos e garantir um alto nível de exatidão e precisão nas determinações (MATO, SUÁREZ-LUQUE, HUIDOBRO, 2005).

A cromatografia líquida de alta eficiência é muito utilizada na análise de alguns compostos majoritários do mosto e do vinho, como os açúcares (MAICAS et al., 1999a; SUBDEN et al., 1998), ácidos orgânicos (ESCOBAL et al., 1997; ZOTOU, LOUKOU, KARAVA, 2004), compostos fenólicos (GAMBELLI; SANTARONI, 2004; GIL-MUÑOZ et al., 1999) e aminoácidos (PÉREZ-COELLO et al., 1999). Resultados obtidos por Walker e colaboradores (2003) demonstraram que determinações com cromatografia líquida de alta eficiência de açúcares, ácidos orgânicos e etanol foram mais precisas que os métodos enzimáticos recomendados por órgãos oficiais como a Organisation

International de la Vigne et du Vin e a American Association of Analytical Chemistry.

3.6.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho

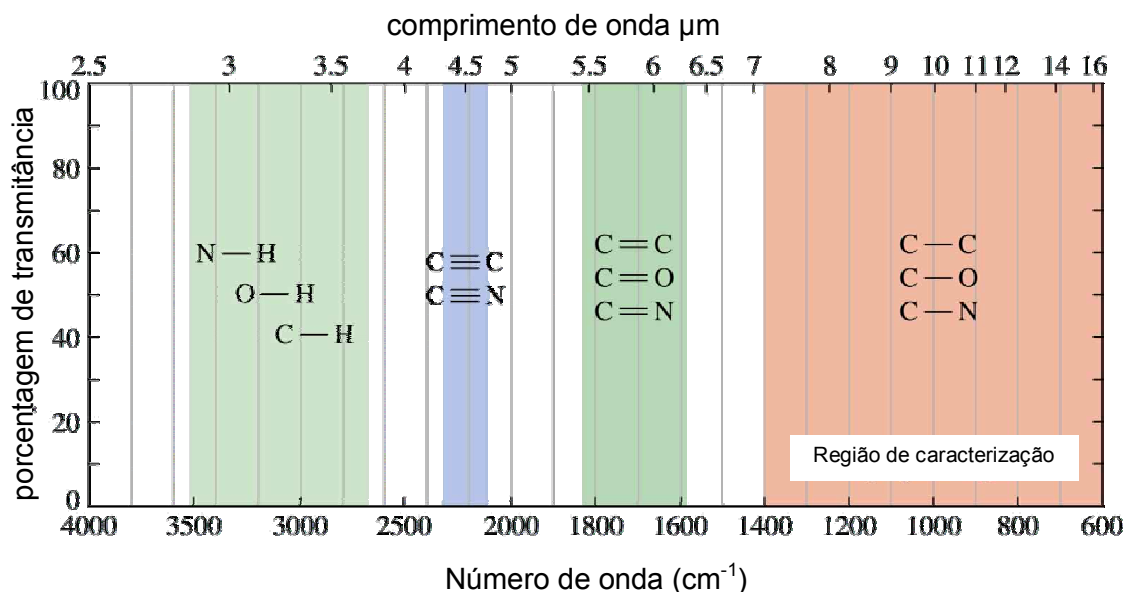
A radiação infravermelha corresponde ao segmento do espectro eletromagnético situado entre as regiões do visível e das microondas, sendo a região de maior interesse para a caracterização de compostos orgânicos a que está situada entre 4.000 e 500 cm^{-1} .

A espectroscopia na região do infravermelho baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências vibracionais específicas. Tais frequências, ou comprimento de onda de uma absorção, são dependentes das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos. A radiação infravermelha quando absorvida por uma molécula orgânica converte se em energia de vibração molecular, no entanto apenas as vibrações que resultam em uma alteração no momento dipolar da molécula são observadas no infravermelho (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1981).

Nas análises com espectroscopia na região do infravermelho o grupo funcional das moléculas geralmente é indicado, porém dificilmente consegue-se determinar a estrutura de uma molécula apenas com dados no infravermelho, sendo que alguns sinais podem ser ambíguos e podem indicar mais de um grupamento funcional. A FIGURA 5 ilustra as frequências de absorção de alguns grupos funcionais (WADE, 2003).

A aplicação dessa técnica analítica no acompanhamento de bioprocessos é vantajosa, pois além de possibilitar a determinação de vários compostos a partir de uma única amostra, é uma técnica rápida, na qual as amostras normalmente não precisam de um pré-tratamento. Urtubia e colaboradores (2004) citam que a técnica de espectroscopia no infravermelho foi empregada com sucesso em diversos bioprocessos, como na produção de antibióticos e no cultivo de células animais, permitindo controlar a metabolização de aminoácidos e açúcares neste último.

FIGURA 5 – FREQUÊNCIAS DE ABSORÇÃO CARACTERÍSTICAS DE GRUPAMENTOS FUNCIONAIS NA REGIÃO ESPECTRAL DE INFRAVERMELHO MÉDIO (600 – 4000 cm^{-1}).



FONTE: WADE, 2003.

No caso das análises de vinho, a espectroscopia na região do infravermelho vem sendo utilizada com êxito em determinações do perfil de açúcares, álcoois, ácidos orgânicos e compostos fenólicos (BOULET, WILLIAMS, DOCO, 2007; COZZOLINO et al., 2004; MOREIRA, SANTOS, 2004; NIEUWOUDT et al., 2006; URTUBIA et al., 2004; VONACH, LENDL, KELLNER, 1998).

3.6.3 Quimiometria

A quimiometria por definição é a área que se refere à aplicação de métodos estatísticos e matemáticos a dados de origem química. Uma das características mais interessantes das técnicas de análises, tais como a ressonância magnética nuclear, a espectroscopia vibracional na região do infravermelho e no ultravioleta/visível e a espectroscopia de massa, é o grande número de variáveis que podem ser obtidas de uma única amostra. Um exemplo é a intensidade de absorção em mil ou mais comprimentos de onda que é rotineiramente registrada em um único espectro, um fato que sugere a necessidade de ferramentas adequadas para o tratamento desses dados, de

modo a maximizar a extração de informações relevantes (FERREIRA et al., 1999).

Em geral, as concentrações dos compostos de interesse em uma amostra são determinadas por resolução de um sistema de equações derivadas da lei de Lambert-Beer, na qual a concentração de um composto é diretamente proporcional a sua absorbância. No entanto, essa relação é afetada com a presença de outros compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda do composto de interesse. Em outros casos, curvas de calibração são construídas em cada comprimento de onda a partir de soluções padrão, a fim de estabelecer constantes de proporcionalidade entre a concentração e a intensidade de absorção dos compostos. Muitas vezes, é possível obter-se bons resultados com esta abordagem, porém quando se analisam amostras complexas, podem surgir problemas devido às interferências espectrais e desconhecimento da real identidade da amostra. Nesses casos, há a necessidade de utilizar a matemática multivariada ou métodos estatísticos multivariados, com o objetivo de melhorar a qualidade dos resultados, ou facilitar a sua interpretação (FERREIRA et al., 1999; MOREIRA, SANTOS, 2004).

Os sistemas multivariados permitem medir simultaneamente muitas variáveis ao se analisar uma amostra qualquer. Nesses sistemas, a conversão da resposta instrumental no dado químico de interesse requer a utilização de técnicas de estatística multivariada, álgebra matricial e análise numérica. Um exemplo de método estatístico utilizado para análise desses dados é a análise de componentes principais. Esse método consiste na manipulação de uma matriz de dados com o objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis com um número menor de fatores. Constrói-se um novo sistema de eixos denominado componentes principais para representar as amostras, assim a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões. Em termos geométricos a função dos componentes principais é descrever a variação ou espalhamento entre os pontos usando o menor número possível de eixos (FERREIRA et al., 1999).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Uvas

Para a realização dos processos de microvinificação foi utilizada a variedade de uva Cabernet Sauvignon safra 2005, proveniente da Serra Gaúcha, da cidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul.

4.1.2. Microrganismo

Para a realização dos processos de microvinificação foi utilizada uma levedura seca ativa, Maurivin PDM *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus*, fornecida pela Bacardi-Martini Indústria e Comércio Ltda, proveniente do fabricante Coatec, localizado em Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul. Segundo dados do fabricante esta levedura comercial contribui moderadamente no aroma do vinho e é recomendada para a produção de vinhos brancos, tintos e vinhos espumantes.

4.1.3. Reagentes, Meios de cultura e Gás nitrogênio.

Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma, Chemicals, Synth, Merck do Brasil, Difco e do Oxigênio do Brasil. Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Métodos Gerais

Os métodos gerais utilizados nos experimentos, assim como os equipamentos utilizados, estão relacionados a seguir:

- a) as medidas de massa foram realizadas em balança digital analítica Marte, modelo AR2140 Adventurer;

b) os procedimentos de semeadura em placas foram realizados em fluxo laminar TROX do Brasil, modelo FLV classe I;

c) as esterilizações dos materiais e meio de cultura foram realizadas em autoclave Phoenix modelo AV50, sob pressão de 1 atmosfera e a temperatura de 121 °C durante 15 minutos;

d) a microscopia foi realizada em microscópio ótico modelo Olympus CX 41.

e) as centrifugações foram realizadas em centrífuga Eppendorf, modelo 5410.

f) as medidas de pH foram realizadas em aparelho Micronal, modelo B-374 e WTW 82362, modelo 330i.

4.2.2 Processos de Microvinificação

As uvas foram lavadas, separadas da ráquis e então esmagadas para o rompimento dos grãos, procurando não danificar as sementes, com um volume resultante de 11,5 L. Uma alíquota do mosto de uva obtido, foi retirada para as determinações de açúcares totais e pH. A partir da análise desses resultados foi planejada a correção da concentração de açúcar total presente no mosto para a obtenção do teor alcoólico para vinhos finos de 8,6 a 14% v/v como fixado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2004).

Os processos de microvinificação foram conduzidos em frascos erlenmeyer com capacidade de 2 L, fechados com tampões de algodão em gaze.

Em cada frasco erlenmeyer foi adicionado 900 mL de mosto para realização de quatro processos de microvinificação A, B, D e E e um ensaio controle C, todos em duplicata. Somente para o processo A as películas foram removidas por filtração utilizando gaze. Os mostos dos processos A, B e C foram esterilizados por calor úmido, vapor de fluxo livre, em autoclave Phoenix, modelo AV50, a 100 °C por trinta minutos, sendo o ensaio C o controle de esterilidade. No processo D o mosto contido em cada frasco foi sulfitado utilizando 371,7 mg de metabissulfito de potássio. O metabissulfito de potássio foi previamente dissolvido em um volume de mosto e então adicionado ao restante do mosto contido nos frascos erlenmeyer, para facilitar a

homogeneização. O processo E foi conduzido utilizando mosto com as películas da uva sem ser submetido à esterilização ou desinfecção.

Após o preparo dos mostos, a levedura seca foi reidratada em água destilada estéril a 35 °C durante vinte minutos e adicionada aos mostos dos processos A, B e D na proporção de 20 g de levedura seca por 100 L de mosto, segundo instruções do fabricante. A fim de se avaliar a concentração celular no início dos processos A, B e D foi realizada a contagem do número de células viáveis/mL da suspensão, segundo Madigan, Martinko, Parker (2004).

No processo D sulfitado, a levedura foi acrescentada após seis horas da adição do metabissulfito de potássio no mosto. A determinação deste tempo de repouso foi decorrente de um experimento prévio que consistiu na adição do mosto de uva em placas contendo meio sólido YPG 2%, composto de glicose 20 g/L, extrato de levedura 10 g/L e peptona 10 g/L, logo após a adição de metabissulfito de potássio e a cada hora durante um período de nove horas. As placas foram colocadas em estufa microbiológica BOD Tecnal, modelo TE-391, a 28 °C e a 35 °C durante 72 horas para verificação do crescimento de microrganismos. O acompanhamento do crescimento nas placas foi realizado pelo método de contagem em placa, determinando-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC).

Os processos de microvinificação foram realizados em sala com controle de temperatura, retirando-se amostras para as análises a cada 24 horas, durante 168 horas. A cada coleta foi registrada a temperatura e o pH das amostras.

Não foram realizadas as etapas de maturação e estabilização, uma vez que o objetivo do trabalho foi acompanhar a primeira fermentação, a fermentação alcoólica, na qual os açúcares do mosto são transformados em álcool com liberação de dióxido de carbono, e não analisar o produto final.

4.2.2.1 Controle de esterilidade

Para verificar a eficiência do processo de esterilização por calor úmido em autoclave a 100 °C por vinte minutos dos mostos dos processos de microvinificação A e B, foi realizado o ensaio C, um experimento de controle de esterilidade, composto de mosto com casca esterilizado sem a adição de levedura.

Após 168 horas do início dos processos de microvinificação uma alíquota de 100 µL do ensaio controle C foi adicionada em placas contendo meio sólido YPG 2%, composto de glicose 20 g/L, extrato de levedura 10 g/L e peptona 10 g/L.

Em paralelo foram realizados ensaios controles (positivo e negativo). O controle positivo consistiu de placa contendo meio sólido YPG 2% após a semeadura por esgotamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 e o controle negativo somente da placa contendo o mesmo meio.

As placas foram colocadas em estufa microbiológica BOD Tecnal modelo TE-391, a 28 °C por 72 horas. O experimento de controle de esterilidade foi realizado em duplicata.

4.2.3 Determinação de Açúcares Totais

Foi empregado o método de Eynon-Lane, no qual os açúcares não redutores sofrem hidrólise prévia em meio ácido e então reagem com os íons cúpricos da solução de Soxhlet, reduzindo-os a íons cuprosos, sob a ação de calor em meio alcalino. Ao reagir os açúcares sofrem oxidação, enquanto o cobre (II) é reduzido a cobre (I), formando-se um precipitado vermelho de óxido cuproso (BRASIL, 2005).

4.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

4.2.4.1 Determinação de glucose, frutose e etanol

As análises dos teores de glucose, frutose e etanol dos processos de microvinificação A, B e D por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em equipamento Shimadzu, módulo RID 10A detector de índice de refração com coluna de troca iônica Aminex HPX – 87H da Bio-Rad. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico 8 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL.

4.2.4.2 Determinação de ácidos orgânicos

Para a determinação dos ácidos orgânicos foi realizado um pré-tratamento nas amostras para a retirada da matéria corante e dos açúcares. Cada amostra de 3mL foi eluída em uma coluna com polivinilpirrolidona, para a retirada da matéria corante e, em seguida em coluna contendo resina de troca iônica DOWEX 2, para a retirada dos açúcares. Após esse processo, as amostras foram injetadas no cromatógrafo.

As análises de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em equipamento Shimadzu, módulo SPD-M10A detector DAD “Diode Array Detector” com coluna de troca iônica Aminex HPX – 87H da Bio-Rad. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico 8 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL. O detector DAD foi utilizado para análise dos ácidos orgânicos com geração de cromatogramas com comprimentos de ondas de 210 nm para os ácidos málico e succínico e 254 nm para os ácidos tartárico e lático.

4.2.4.3 Determinação de compostos fenólicos

As análises cromatográficas de ácidos fenólicos nas amostras dos processos em estudo foram realizadas pelo método descrito por Maraschin (2003). Foram transferidos 5 mL de amostra para tubos de ensaio e adicionaram-se 15 mL de acetato de etila e carbonato de sódio 1 g% p/v. A atmosfera interna dos tubos foi substituída por gás nitrogênio, seguido da incubação do material a 4 °C na ausência de luz, por 12 horas. Em seguida, alíquotas de 14 mL da fração orgânica foram coletadas, com posterior remoção do solvente em estufa a 50 °C e ressuspensão em 1,5 mL de solução de metanol-ácido clorídrico 1% v/v. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos e filtradas em membrana de 0,22 µm. Em seguida foi realizada a injeção de 10 µL de amostra em cromatógrafo Shimadzu LC-10A, equipado com coluna C₁₈ (Shim-Pack CLC-ODS, 250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno), termostatizador de coluna (CTO-10A, 40 °C) e detector ultravioleta-visível, operando em comprimento de onda de 280 nm. Como fase

móvel, foi utilizado água:ácido acético:n-butanol (350:1:10), em fluxo de 1,0 mL/min. A identificação dos compostos fenólicos foi baseada no tempo de retenção de amostras-padrão, analisadas sob as mesmas condições cromatográficas acima descritas. Para efeitos de quantificação dos compostos de interesse, foi utilizado a integral da área dos picos correspondentes, atribuindo-se à área total do cromatograma o valor de 100%. Uma curva-padrão externa de ácido gálico (4 a 16 µg/mL, $r^2 = 0,998$) foi construída e os valores de concentração dos ácidos fenólicos foram expressos em µg de ácido gálico/mL de amostra.

4.2.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho

Para as análises por espectroscopia na região do infravermelho as amostras utilizadas foram liofilizadas e empregaram-se alíquotas de 500 µL por amostra dos processos de microvinificação A, B e D. As análises foram realizadas em equipamento Bruker IFS 55, equipado com sistema ATR de reflexão única, fazendo-se 128 varreduras por amostra, em janela espectral de 600 a 4000 cm^{-1} e com resolução de 8 cm^{-1} .

4.2.6 Análises Estatísticas

Os resultados de cromatografia líquida de alta eficiência para glucose, frutose, etanol e ácido succínico foram analisados por regressão linear simples com o programa Pacote Estatístico para Ciências Sociais (*Statistical Package for Social Sciences – SPSS*) versão 12.0 para Windows. Os resultados de cromatografia líquida de alta eficiência para compostos fenólicos foram analisados por teste de comparação de médias com o programa Sigma Stat versão 3.5 para Windows. As análises de componente principal dos processos de microvinificação foram realizadas empregando o programa Statistica versão 6.0 para Windows.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROCESSOS DE MICROVINIFICAÇÃO

A transformação do mosto de uva em vinho é um processo fermentativo tradicionalmente conduzido por leveduras. A função destas leveduras é catalisar rapidamente a completa conversão dos açúcares da uva, em particular a glucose e a frutose, em etanol, dióxido de carbono e outros metabólitos secundários (BERTHELIS et al., 2004; CAPELLO et al., 2004).

Segundo a equação de Gay-Lussac para fermentação alcoólica ($C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$), um determinado peso de açúcar fermentável deve produzir teoricamente 51,5% de etanol. Cerca de 90% dos sólidos solúveis de um vinho é composto por açúcares fermentáveis e por isso ele permite o cálculo aproximado do rendimento em etanol (AMERINE, OUGH, 1976).

Após a determinação da concentração de açúcares totais (item 4.2.3, página 28) no mosto de uva Cabernet Sauvignon constatou-se a presença de 20,8 g% p/v de açúcares totais, valor suficiente para a obtenção do teor alcoólico de 8,6 a 14% v/v como fixado para vinhos finos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2004).

Outra análise realizada foi a determinação de pH (item 4.2.1, página 27), necessária para o cálculo da adição de metabissulfito de potássio. A sulfitagem é uma prática importante e necessária na vinificação, pois tem o objetivo de paralisar momentaneamente o desenvolvimento de microrganismos existentes no mosto, particularmente os indesejáveis. O valor de pH obtido no mosto de uva Cabernet Sauvignon foi de 3,682. Segundo Pato (1978) o teor de 237 mg de dióxido de enxofre por litro de mosto, na forma de metabissulfito de potássio é recomendado para pH 3,6.

Foram conduzidos quatro processos de microvinificação, A, B, D e E (item 4.2.2, página 27) com mosto de uva Cabernet Sauvignon, em duplicata. Nos processos A, B e D a levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* foi adicionada na concentração de $6,08 \times 10^9$ células viáveis/mL de mosto e no processo E foi realizada uma fermentação espontânea conduzida pelos microrganismos naturalmente presentes no mosto. No processo D, a levedura foi acrescentada após seis horas da adição do metabissulfito de potássio no

mosto. A determinação deste tempo de repouso foi decorrente de um experimento prévio que consistiu na adição do mosto de uva sulfitado em placas contendo meio sólido YPG 2% e crescimento em estufas independentes a 28 °C e a 35 °C durante 72 horas (item 4.2.2, página 27). Durante o acompanhamento do crescimento constatou-se a presença de colônias de bactérias, leveduras e fungos filamentosos em todas as placas até três horas da adição do metabissulfito de potássio, após esse período verificou-se apenas o crescimento de bactérias e leveduras. O controle do crescimento desses microrganismos mostrou o menor número de unidades formadoras de colônia na placa em que foi adicionado o mosto sulfitado depois de seis horas de repouso.

A partir do início dos processos, tempo zero hora da fermentação, logo após a adição da levedura nos mostos dos processos de microvinificação A, B e D, e no processo E, fermentação espontânea, foram retiradas amostras a cada 24 horas para a realização das análises. A cada coleta foi registrada a temperatura e o pH das amostras. Foram realizadas coletas diárias durante dez dias.

A temperatura durante a fermentação em todos os processos permaneceu entre 23 °C e 25 °C, mantendo-se dentro do intervalo de temperatura de 20 °C a 30 °C recomendado para a vinificação de vinhos tintos (CHRISTAKI, TZIA, 2002).

Torija e colaboradores (2003) relatam que o controle de temperatura durante a fermentação é importante uma vez que sua variação pode interromper o processo fermentativo inibindo o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com temperaturas distantes da sua temperatura ótima de crescimento, além de favorecer o crescimento de outras espécies presentes no mosto de uva e promover a perda dos compostos voláteis.

O pH é uma medida do conteúdo de prótons livres em solução e é particularmente importante por seu efeito sobre os microrganismos, a cor, sabor, potencial redox e sobre a proporção entre o dióxido de enxofre livre e combinado (AMERINE, OUGH, 1976; COPAT, 1988).

Os valores de pH registrados nas amostras dos processos de microvinificação A, B e D, durante o período 261 horas estão demonstrados nas FIGURAS 6, 7 e 8 respectivamente.

FIGURA 6 – VARIAÇÃO DOS VALORES DE pH EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “A” UTILIZANDO MOSTO DE UVA SEM PELÍCULAS COM ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus*.

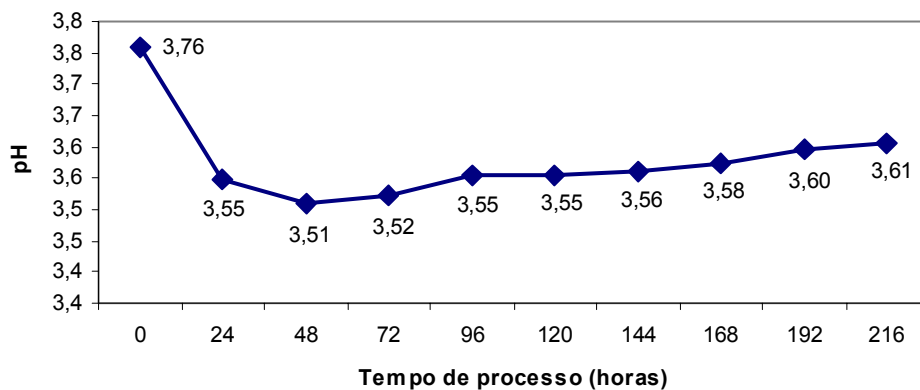


FIGURA 7 – VARIAÇÃO DOS VALORES DE pH EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “B” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS E ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus*.

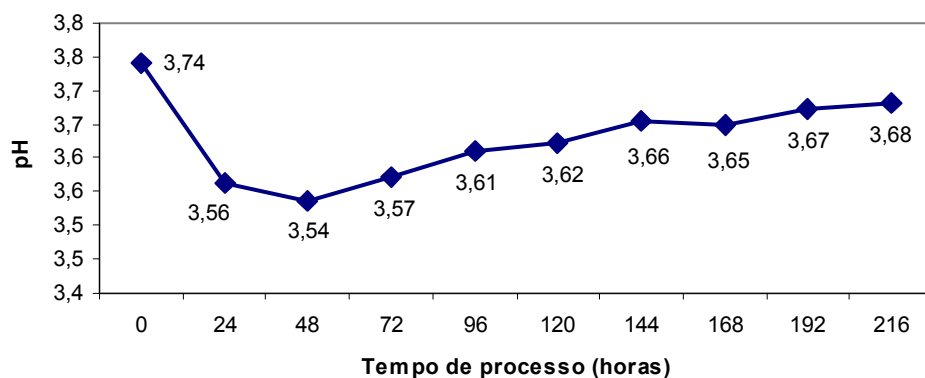
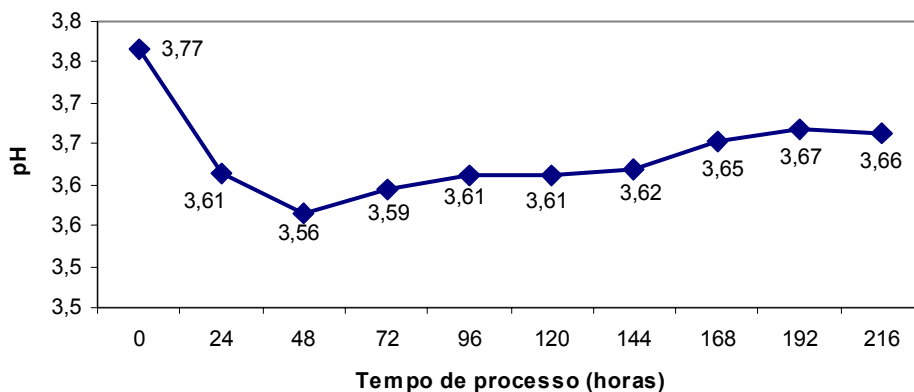


FIGURA 8 – VARIAÇÃO DOS VALORES DE pH EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “D” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS SULFITADO E ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus*.



Os processos apresentaram o valor de pH inicial em torno de 3,7 e após 48 horas obteve-se o menor valor de pH cerca de 3,5, seguida de uma elevação.

Baseando-se em dados de literatura, a diminuição inicial do pH pode ser explicada pela dissolução dos ácidos tartárico, málico e cítrico presentes na película da uva para o mosto, bem como pela produção de outros ácidos como os ácidos succínico e cítrico durante a fermentação alcoólica (RIZZON, MIELE, 2002b; ZOTOU, LOUKOU, KARAVA, 2004). A lenta elevação do pH no decorrer do processo deve-se provavelmente a precipitação do ácido tartárico em bitartarato de potássio, a elevação dos teores de etanol e ao consumo do ácido málico pela levedura (BENASSI, 1997; REDZEPOVIC, et al. 2003).

A fim de explicar o comportamento do pH nos processos, foi utilizada a metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação dos ácidos orgânicos.

Mato e colaboradores (2005) e Zotou e colaboradores (2004) afirmaram que para a determinação de ácidos orgânicos em mosto de uva e vinho há a necessidade de um pré-tratamento da amostra para evitar interferentes como açúcares e matérias corantes que podem eluir juntamente com os ácidos. Esses trabalhos sugerem a utilização de resinas de troca iônica ou sistemas de

extração em fase sólida para a remoção dos açúcares e polivinilpirrolidona (PVPP) para a remoção das matérias corantes.

Foram realizados experimentos utilizando resinas de troca iônica e polivinilpirrolidona para a retirada dos interferentes das amostras dos processos de microvinificação A, B e D. O emprego da polivinilpirrolidona, foi eficiente na remoção das substâncias corantes das amostras dos processos de microvinificação A, B e D, porém as resinas de troca iônica utilizadas não foram capazes de eliminar os açúcares. Desta maneira, em virtude dos resultados obtidos com o pré-tratamento das amostras, apenas o ácido succínico foi determinado nas amostras sem pré-tratamento, utilizando a técnica descrita no item 4.2.4.2. página 30.

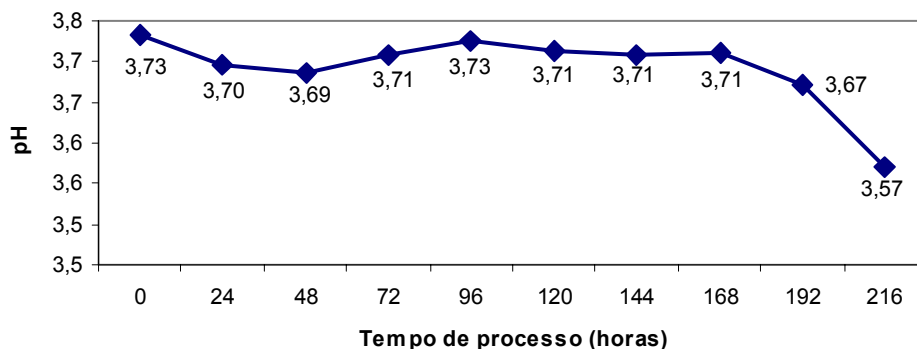
O ácido succínico foi observado pela primeira vez no processo de microvinificação A, mosto sem películas com adição de levedura, em 96 horas, com concentração de 1,72 mg/L. No processo de microvinificação B, mosto com casca e com adição de levedura, e no processo de microvinificação D, mosto sulfitado com adição de levedura, o ácido succínico foi observado em 120 horas com concentração de 14,88 mg/L e 26,19 mg/L, respectivamente.

Os valores de concentração obtidos de ácido succínico em 168 horas para os processos de microvinificação A e B foi de 14,03 mg/L e 16,61 mg/L, respectivamente. No processo D foi verificada uma diminuição de 26,19 mg/L para 15,29 mg/L.

Nos processos A e B a produção de ácido succínico foi continua, esse ácido é produzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica a partir da atividade de enzimas respiratórias que catalizam a transformação do succinil-CoA a ácido succínico. O consumo de ácido succínico verificado no processo D é decorrente da ação espoliativa de bactérias presentes no mosto (ARIKAWA et al, 1999).

O comportamento de pH apresentado no processo de microvinificação E, fermentação espontânea, é diferente dos comportamentos verificados nos processos A, B e D, como demonstra a FIGURA 9.

FIGURA 9 – VARIAÇÃO DOS VALORES DE pH EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “E” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS EM FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA.



Segundo Dorneles (2003) a fermentação espontânea normalmente é conduzida por uma sucessão de populações de leveduras que iniciam com espécies relativamente fracas e seus metabolismos são mais difíceis de serem previstos em comparação aos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A análise dos valores de pH obtida no processo de microvinificação E, fermentação espontânea, sugere o início da fermentação após 168 horas de processo. Ciani e Pepe (2002) demonstraram que sem a adição de leveduras selecionadas o início da fermentação alcoólica é tardio, pois a população selvagem de leveduras *Saccharomyces* deve substituir aos poucos as leveduras selvagens não-*Saccharomyces* e dominar a fermentação alcoólica.

5.1.1 Controle de Esterilidade

A fim de comprovar se a esterilização dos mostos, dos processos de microvinificação A e B, foi eficaz na eliminação da flora microbiota naturalmente presente na uva, no término dos processos de microvinificação, o mosto com películas esterilizado sem a adição da levedura, ensaio controle C, foi adicionado em meio sólido YPG 2% (item 4.2.2.1, página 28).

O crescimento de microrganismos em estufa a 28 °C foi acompanhado durante o período de 72 horas. Após esse período não houve desenvolvimento de colônias nas placas utilizadas no ensaio controle C e no controle negativo.

No ensaio controle positivo, foi verificado o crescimento de colônias com características morfológicas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Esses resultados comprovaram a eficácia da esterilização dos mostos dos processos de microvinificação A e B, garantindo que esses processos foram conduzidos exclusivamente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* adicionada aos mesmos.

5.1.2 Determinação de Glucose, Frutose e Etanol

A etapa mais importante da vinificação é a fermentação alcoólica dos açúcares da uva, em especial das hexoses (glucose e frutose), que resulta principalmente em etanol e dióxido de carbono, e subprodutos (MORENO-ARRIBAS, POLO, 2005)

Os resultados das análises do consumo de glucose e frutose e da produção de etanol, durante a fermentação alcoólica, por cromatografia líquida de alta eficiência, dos processos A, B e D estão mostrados nas FIGURAS 10, 11 e 12, respectivamente. Os resultados dos açúcares estão expressos em g/L e os resultados de etanol em % v/v.

FIGURA 10 – CONSUMO DE GLUCOSE E FRUTOSE (g/L) E PRODUÇÃO DE ETANOL (% v/v) EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “A” UTILIZANDO MOSTO DE UVA SEM PELÍCULAS COM ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus*.

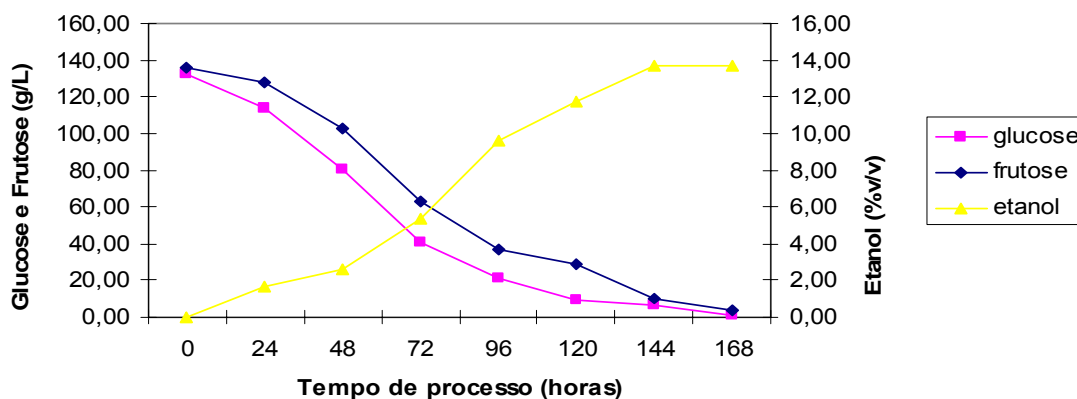


FIGURA 11 – CONSUMO DE GLUCOSE E FRUTOSE (g/L) E PRODUÇÃO DE ETANOL (% v/v) EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “B” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS E ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus*.

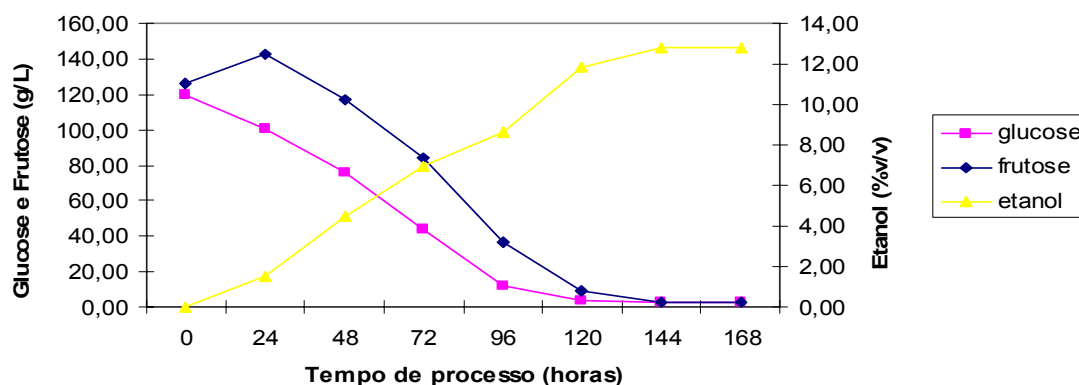
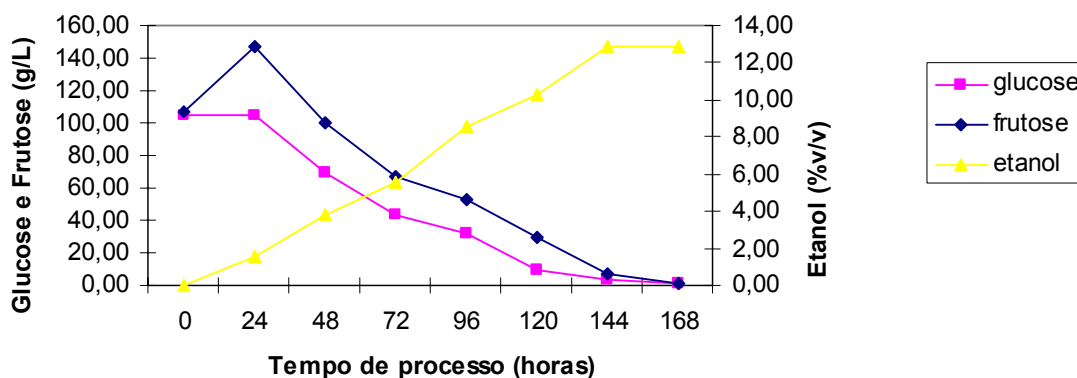


FIGURA 12 – CONSUMO DE GLUCOSE E FRUTOSE (g/L) E PRODUÇÃO DE ETANOL (% v/v) EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “D” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS SULFITADO E ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus*.



A uva normalmente apresenta concentrações iguais ou muito próximas de glucose e frutose e as leveduras vínicas como a *Saccharomyces cerevisiae* apresentam uma predileção pela glucose apesar do consumo de frutose ser concomitante (BERTHELIS et al., 2004).

A maior concentração inicial de glucose e frutose nos processos de microvinificação A e B (FIGURAS 10 e 11) em relação a concentração inicial no processo D (FIGURA 12), pode ser explicada pelo aquecimento durante a esterilização dos mostos empregados nos processos A e B. Segundo Guerra (2003b), o aquecimento da uva recém esmagada e desengaçada promove maior extração dos compostos contidos nas películas e na polpa.

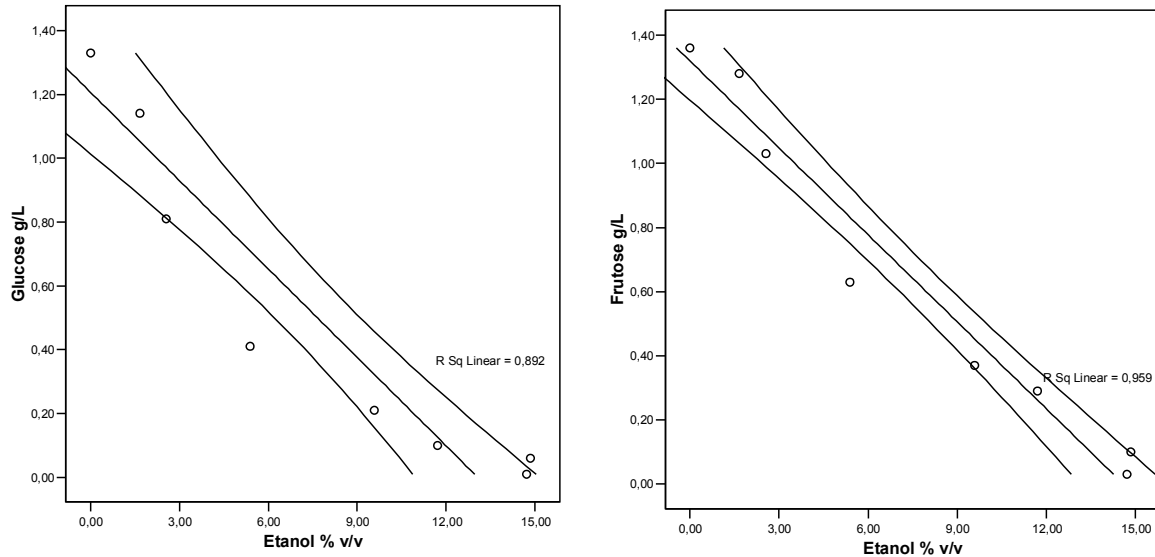
Nas primeiras 24 horas, no processo A o consumo de glucose foi duas vezes maior em relação à frutose, esse comportamento foi observado durante todo o processo. Nos processos B e D a concentração de frutose aumentou cerca de 13% e 38% respectivamente. Segundo Daudt e Simon (2001), os açúcares são armazenados em vacúolos na uva madura. Assim, o aumento na concentração frutose nos processos B e D provavelmente ocorreu pela presença das películas nestes processos.

No término dos processos, após 168 horas, as concentrações residuais de glucose e frutose foram de 1,32 g/L e 3,28 g/L no processo A, de 3,01 g/L e 2,48 g/L no processo B e de 1,41 g/L e 1,52 g/L no processo D, respectivamente. Segundo Dubourdieu (2003), a fermentação alcoólica termina quando os teores de açúcares são da ordem de 2 a 3 g/L. Berthels e colaboradores (2004), afirmam que o nível de frutose residual, sozinho, encontrado em vinhos secos atinge concentrações superiores a 2 g/L. Sendo assim, houve fermentação alcoólica completa em todos os processos.

Por estequiometria, segundo a equação de Gay-Lussac pode-se fazer uma estimativa da quantidade de álcool provavelmente formada pela fermentação dos açúcares. Dessa maneira estima-se que 51,5% de 100 gramas de açúcar são convertidos em álcool. Nos processos de microvinificação A, B e D verificou-se, dentro das expectativas teóricas, a concentração final de etanol de 13,72%, 12,81% e 12,91%, v/v respectivamente.

Os resultados obtidos de consumo de glucose e frutose nos processos de microvinificação A, B e D foram relacionados com a produção de etanol e analisados por regressão linear simples, apresentando bons resultados de coeficiente de regressão (r^2) e com resultados dentro do intervalo de 95% de confiança (IC 95%), como mostram as FIGURAS 13,14 e 15.

FIGURA 13 – PRODUÇÃO DE ETANOL EM FUNÇÃO DO CONSUMO DE GLUCOSE E FRUTOSE NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “A” UTILIZANDO MOSTO DE UVA SEM PELÍCULAS COM ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus* ANALISADOS POR REGRESSÃO LINEAR SIMPLES.

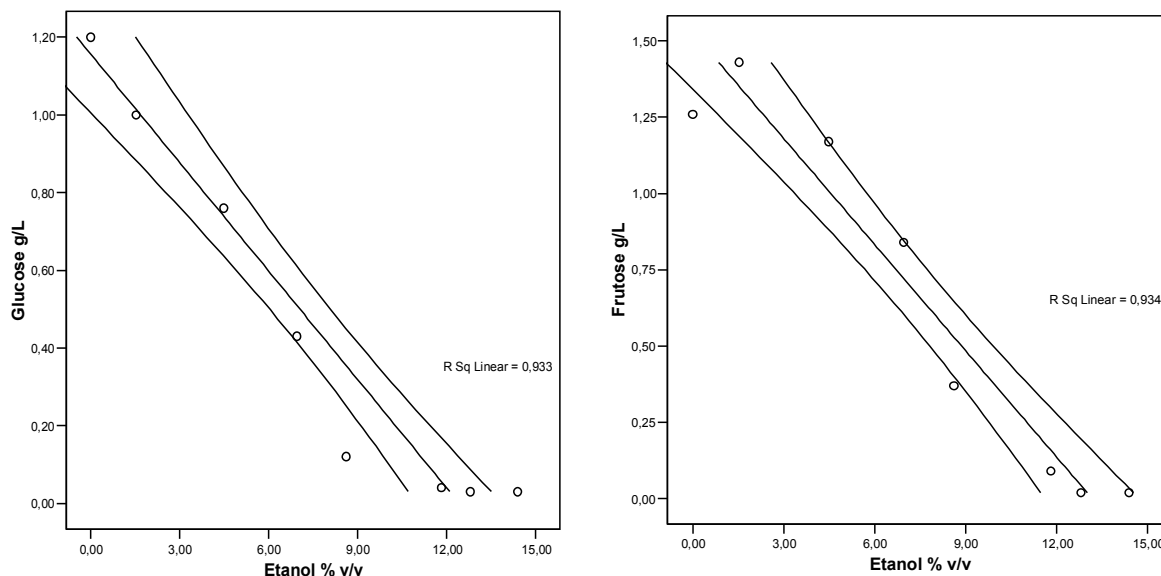


NOTA: R Sq Linear corresponde a r^2 .

O valor de p para todos os modelos analisados foi menor que 0,01. As curvas nos gráficos representam o intervalo de 95% de confiança (IC 95%). Os valores de r^2 obtidos com os resultados do processo de microvinificação B ($r^2=0,933$ para a glucose e $r^2=0,934$ para a frutose) demonstraram que não houve diferença entre o consumo desses açúcares na produção do etanol (FIGURA 14). Já no processo de microvinificação A a análise indica que houve uma maior participação da frutose na produção de etanol (FIGURA 13), enquanto os valores do processo D demonstram uma maior participação da glucose (FIGURA 15).

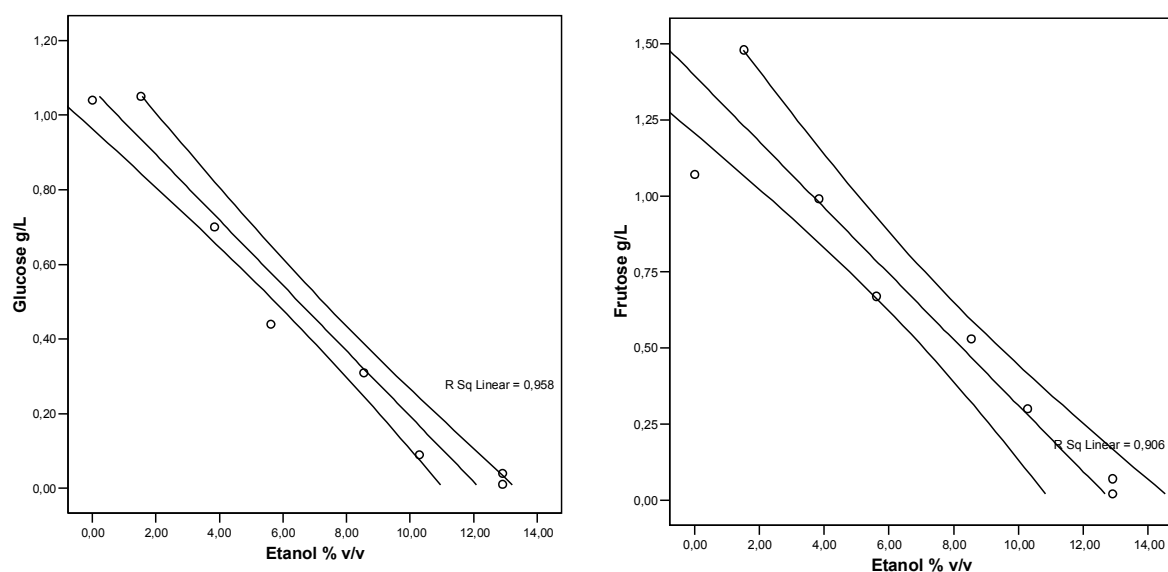
Berthels e colaboradores (2004) demonstraram que o etanol e o nitrogênio no meio têm um efeito inibitório sobre a utilização da glucose e/ou da frutose e afirma que a discrepância entre a utilização desses açúcares na fermentação alcoólica depende ainda das características das leveduras presentes no meio e de condições externas.

FIGURA 14 – PRODUÇÃO DE ETANOL EM FUNÇÃO DO CONSUMO DE GLUCOSE E FRUTOSE NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “B” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS E ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus* ANALISADO POR REGRESSÃO LINEAR SIMPLES.



NOTA: R Sq Linear corresponde a r^2 .

FIGURA 15 – PRODUÇÃO DE ETANOL EM FUNÇÃO DO CONSUMO DE GLUCOSE E FRUTOSE NO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “D” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS, SULFITADO E ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus* ANALISADO POR REGRESSÃO LINEAR SIMPLES.



NOTA: R Sq Linear corresponde a r^2 .

5.1.3 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos compreendem uma classe de substâncias de diferentes origens, estruturas e características, que têm uma grande influência sobre as características sensoriais do vinho. Assim cada substância contribui de maneira distinta com a formação da identidade do vinho (MAZZA et al, 1999).

Na TABELA 1 estão representadas as variações dos teores de ácidos fenólicos (ácido cinâmico, ácido p-coumárico e ácido caféico), de epicatequina (tanino), de quercetina (flavanóide) e do estilbeno trans-resveratrol durante a fermentação alcoólica, nos processos de microvinificação A, B e D respectivamente.

Como pode ser observado na TABELA 1, as concentrações dos ácidos fenólicos: ácido cinâmico, ácido p-coumárico e ácido caféico mantiveram-se praticamente inalteradas no processo A. No processo B a concentração inicial de ácido cinâmico foi de 0,26 mg/L e no processo D de 0,07 mg/L e ao término da fermentação as concentrações finais foram de 2,22 mg/L e 3,93 mg/L, respectivamente. Em relação aos teores de ácido p-coumárico, ambos processos apresentaram uma liberação crescente durante a fermentação alcoólica, atingindo concentrações superiores a 5,0 mg/L. Entretanto, o ácido caféico apresentou um comportamento distinto do apresentado pelos ácidos cinâmico e p-coumárico, constatou-se que no processo B este composto apresentou uma concentração inicial de 5,23 mg/L, enquanto um teor de 0,72 mg/L foi detectado no início do processo D.

Os resultados de concentração de ácidos fenólicos dos processos B e D mostram que houve uma maior liberação de ácido cinâmico, ácido p-coumárico e ácido caféico, comparado aos resultados apresentados pelo processo A, demonstrando que a presença das películas é uma fonte importante na liberação desses compostos.

Netzel e colaboradores (2003) evidenciaram que o aquecimento do mosto facilita a liberação dos ácidos fenólicos. Esses resultados sugerem que as diferenças nas concentrações iniciais dos ácidos fenólicos nos processos B e D podem ser decorrentes do aquecimento realizado no mosto do processo B.

Durante a fermentação alcoólica o ácido fenólico encontrado em maior concentração nos processos B e D foi o ácido caféico com 5,75 mg/L e 5,16 mg/L, respectivamente, e no processo A foi o ácido p-coumárico com 0,77 mg/L. Valores próximos a estes foram obtidos por Gil-Muñoz e colaboradores (1999) que verificaram em experimentos a concentração de 6,80 mg/L de ácido caféico e 1,02 mg/L de ácido p-coumárico no sétimo dia de vinificação de mosto uva tinta.

Castellarri e colaboradores (2002) mostraram as variações nos teores de ácidos caféico e ácido p-coumárico em vinhos Cabernet Sauvignon. O ácido caféico apresentou concentração mínima de 2,2 mg/L e máxima de 8,7 mg/L, já o ácido p-coumárico apresentou concentrações entre 0,5 e 3,1 mg/L. Kallithraka e colaboradores (2006) também analisaram vinhos de uva Cabernet Sauvignon e obtiveram valores de 7,70 mg/L para o ácido caféico e de 1,59 mg/L para o ácido p-coumárico.

Os resultados apresentados na TABELA 1 mostram que a maior liberação do tanino epicatequina, foi constatada no processo D com concentração de 4,76 mg/L, quando comparado aos processos A e B.

O valor apresentado pelo processo D pode estar relacionado a presença dos taninos principalmente nas películas e sementes das uvas (MAZZA et al., 1999).

Gil-Muñoz e colaboradores (1999) obtiveram 4,51 mg/L de epicatequina em sete dias de processo de vinificação com uva tinta, e demonstraram que essa concentração variou durante a fase de maturação do vinho em decorrência de que os taninos participam de reações de complexação com antocianinas e na formação de procianidinas e outros compostos poliméricos.

Os flavonóides constituem uma pequena porção dos compostos fenólicos presentes no vinho, porém apesar de sua baixa concentração eles são importantes na pigmentação do vinho, alterando sua cor e estabilizando pigmentos (GIL-MUÑOZ et al, 1999).

Conforme apresentado na TABELA 1, durante a fermentação alcoólica foi verificado variação na concentração do flavonóide quercetina, nos processos de microvinificação A, B e D.

As variações ocorridas nas concentrações dos compostos fenólicos durante o processo de fermentação podem ser explicadas pelas reações de oxidação, polimerização, precipitação e degradação desses compostos. As variáveis responsáveis por essas reações são muitas podendo envolver desde a casta da uva, os microrganismos e a metodologia de vinificação empregada (COZZOLINO et al., 2004; ZOECKLEIN et al., 2001).

Os resultados de *trans*-resveratrol representados na TABELA 1 evidenciam que nos processos A e B houve uma liberação de *trans*-resveratrol superior à apresentada pelo processo D. Enquanto nos processos A e B as concentrações de *trans*-resveratrol ultrapassaram 2,0 mg/L, a concentração desse composto no processo D permaneceu em torno de 0,16 mg/L.

Castellari e colaboradores (2002) obtiveram teores de *trans*-resveratrol de 0,2 mg/L a 1,5 mg/L em vinhos Cabernet Sauvignon.

As concentrações dos compostos fenólicos ácido cinâmico, ácido caféico, ácido p-coumárico, epicatequina, quercetina e *trans*-resveratrol determinadas nos processos de microvinificação A, B e D foram analisadas por teste de comparação de médias. Em relação ao teor de ácido p-coumárico o processo A apresentou diferença significativa em relação aos processos B e D, com valor de p maior que 0,05. Os teores de ácido caféico apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os processos de microvinificação A, B e D. O processo de microvinificação D mostrou diferença significativa no teor de *trans*-resveratrol em relação aos processos A e B. No entanto, os teores de epicatequina, quercetina e ácido cinâmico não apresentaram diferenças significativas entre os processos de microvinificação A, B e D, com valores de p menores que 0,05.

TABELA 1 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS (mg/L) DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA NOS PROCESSOS DE MICROVINIFICAÇÃO.

Tempo de porcesso (horas)	Ácido cinâmico			Ácido caféico			Ácido p-coumárico			Epicatequina			Quercitina			Trans-resveratrol		
	A	B	D	A	B	D	A	B	D	A	B	D	A	B	D	A	B	D
0	0,07	0,26	0,07	0,07	5,23	0,72	0,12	0,59	0,06	0,49	0,63	0,08	1,61	0,33	0,29	0,06	0,69	0,09
24	0,11	0,42	0,12	0,07	4,80	0,88	0,12	0,62	0,07	1,54	0,69	0,21	1,44	1,53	0,43	0,08	1,52	0,14
48	0,10	0,46	0,34	0,07	5,34	2,18	0,13	0,77	0,66	1,20	0,73	1,22	2,30	1,87	0,37	1,51	1,66	0,15
72	0,10	1,25	0,77	0,06	8,48	4,06	0,14	2,60	2,62	1,99	2,09	1,61	3,29	3,29	0,48	1,76	2,81	0,17
96	0,16	3,92	0,74	0,07	7,24	4,95	0,16	4,80	3,01	1,46	1,94	3,52	2,70	3,19	4,24	2,12	3,02	0,15
120	0,17	2,62	2,35	0,05	6,02	5,16	0,77	4,76	3,32	1,58	0,57	3,96	2,65	2,89	2,79	2,17	2,09	0,19
144	0,13	2,22	3,93	0,06	5,75	2,71	0,29	5,82	5,21	1,51	0,85	4,76	1,98	2,63	3,86	2,26	2,28	0,23

Nota: Processos de microvinificação

A: Mosto de uva sem películas com adição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus*.

B: Mosto de uva com películas e adição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus*.

D: Mosto de uva com películas sulfitado e adição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus*.

5.1.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho permite acompanhar o processo de vinificação fornecendo dados de compostos presentes no meio, sendo esses previamente conhecidos ou não. A fim de acompanhar a fermentação alcoólica durante os processos de microvinificação, foram realizadas análises com espectroscopia no infravermelho dos processos de microvinificação A, B e D.

As FIGURAS 16, 17 e 18 mostram os espectros na região do infravermelho do processo A utilizando mosto de uva sem películas com adição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* nos tempos zero, 96 e 168 horas, respectivamente, compreendendo a faixa espectral de 4000 a 500 cm^{-1} . No início da fermentação destacaram-se as bandas em: 3300 cm^{-1} relacionada ao estiramento O-H, 2900 cm^{-1} associada ao estiramento de C-H de grupamento CH_2 e CH_3 , 1630 cm^{-1} sugestiva de estiramento de ligações C=O, C=C e C=N; e 1450-1250 cm^{-1} relacionadas à deformação C-H de cadeias carbônicas e deformação C-O, 1150-1010 cm^{-1} associadas à deformação O-H e C-O e 920-750 cm^{-1} associadas à deformações de ligações de anéis aromáticos substituídos (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1981).

A comparação dos espectros na região do infravermelho no decorrer do processo A demonstrou que as principais mudanças ocorridas na composição das amostras estavam relacionadas às regiões: de 1750-1610 cm^{-1} , referentes ao estiramento C=O e C=C, que segundo Cozzolino e colaboradores (2004) refletem em mudanças nas concentrações de açúcares, compostos fenólicos e taninos; de 1450-1250 cm^{-1} relacionadas a deformação C-H de cadeias carbônicas e deformações C-O de ácidos e ésteres (BOULET, WILLIAMS, DOCO, 2007) e 1150-1010 cm^{-1} associadas a deformação O-H e C-O de etanol, ácidos orgânicos e açúcares (MOREIRA, SANTOS, 2004).

FIGURA 16 – ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “A” UTILIZANDO MOSTO DE UVA SEM PELÍCULAS COM ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus* NO TEMPO ZERO HORA DE FERMENTAÇÃO.

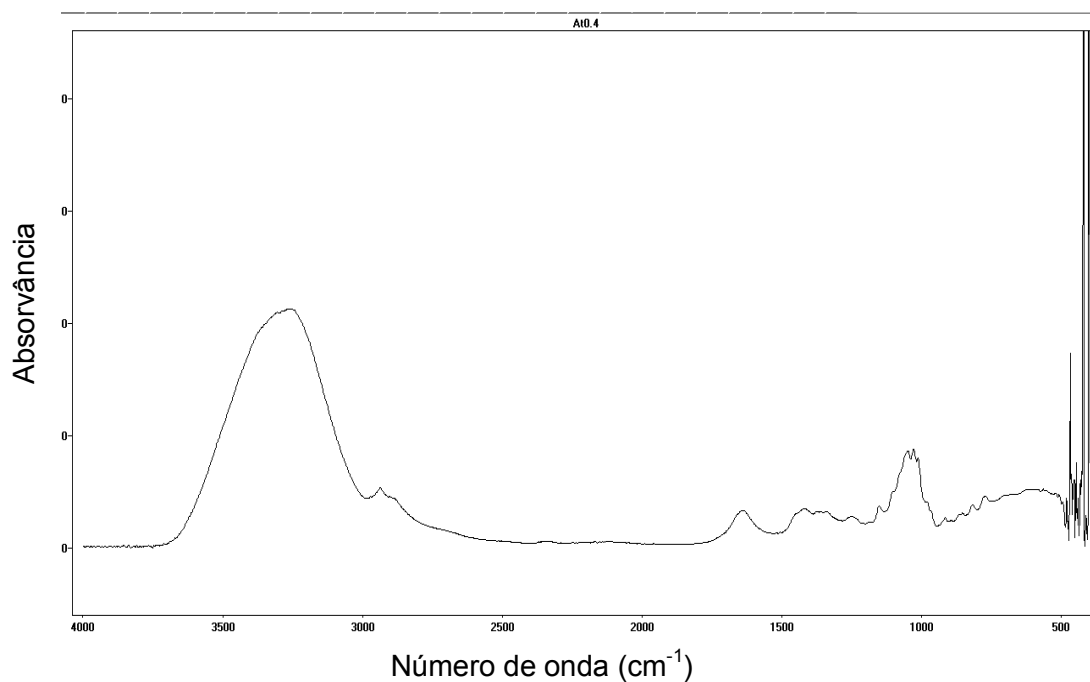
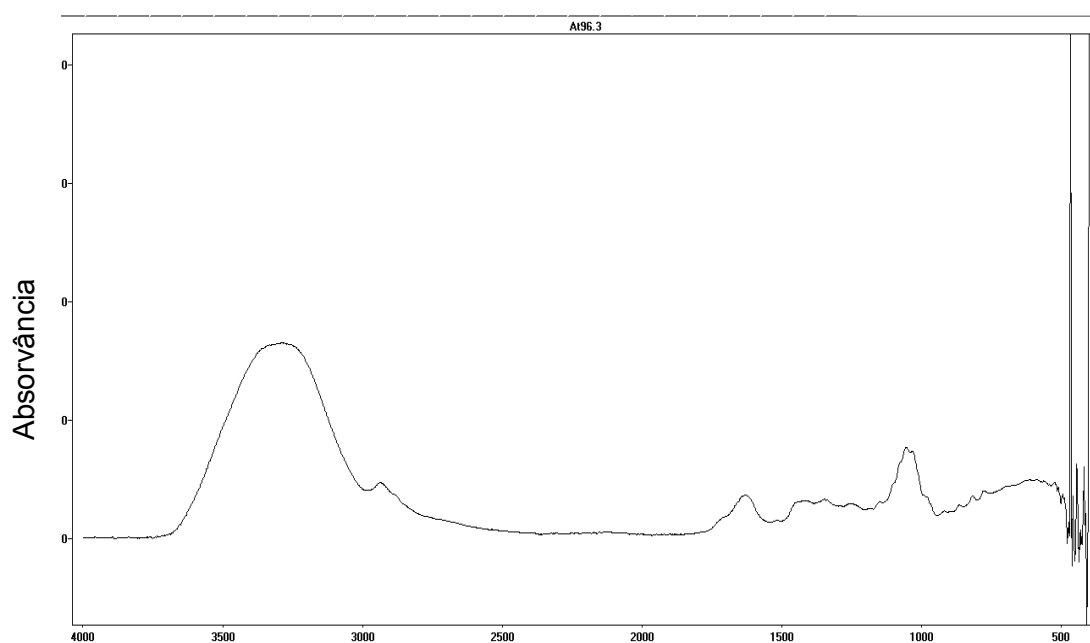
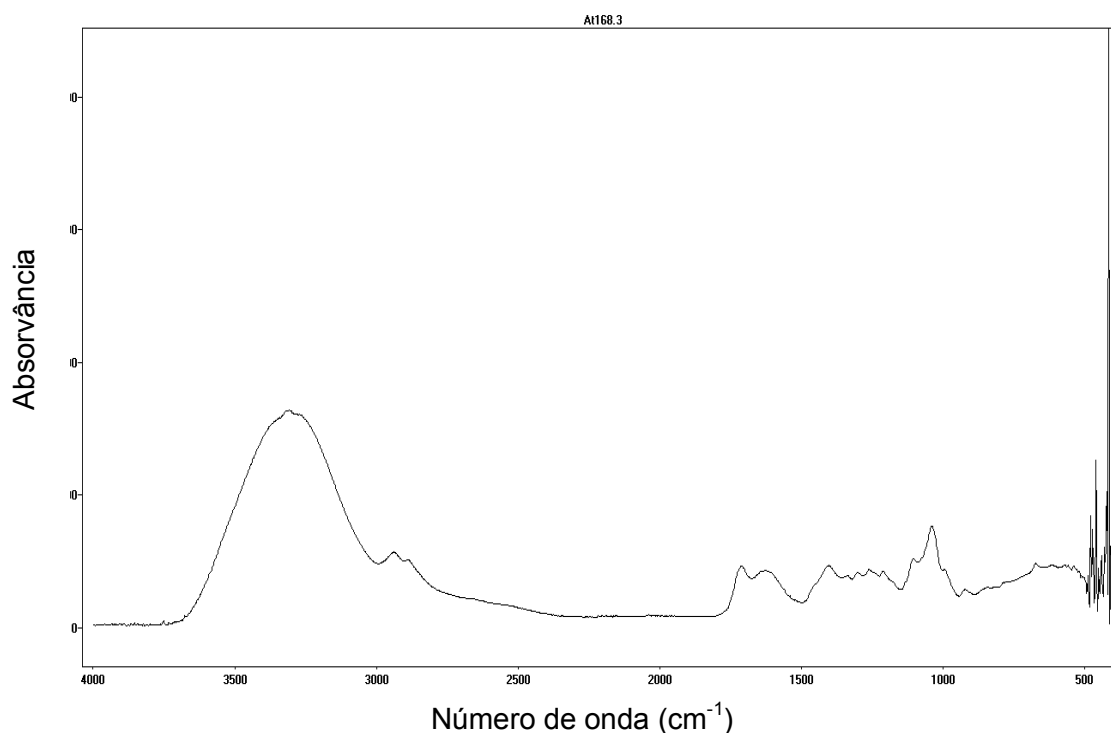


FIGURA 17 – ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “A” UTILIZANDO MOSTO DE UVA SEM PELÍCULAS COM ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus* EM 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO.



Número de onda (cm^{-1})

FIGURA 18 – ESPECTRO NA REGIÃO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “A” UTILIZANDO MOSTO DE UVA SEM PELÍCULAS COM ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus* EM 168 HORAS DE FERMENTAÇÃO.



As FIGURAS 19, 20 e 21 exibem os espectros na região do infravermelho do processo B utilizando mosto de uva com películas e adição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* nos tempos zero, 96 e 168 horas de processo, respectivamente, compreendendo a faixa espectral de 4000 a 500 cm^{-1} .

Assim como no processo A as bandas observadas no início do processo B foram: 3300 cm^{-1} relacionada ao estiramento O-H, 2900 cm^{-1} associada ao estiramento de C-H de grupamento CH_2 e CH_3 , 1630 cm^{-1} sugestiva de estiramento C=O, C=C ou C=N. A faixa espectral que compreende o intervalo de 1500 a 500 cm^{-1} , sugeriu que o processo B apresentou diferença na região 1150-1010 cm^{-1} quando comparado ao processo A. Segundo Moreira e Santos (2004) essa região está relacionada a deformações de ligações C-O e O-H de álcool, açúcares e ácidos orgânicos, indicando que essa diferença entre os processos A e B no início da fermentação esteja relacionada com o conteúdo

de ácidos orgânicos. As regiões 1450-1250 cm^{-1} relacionadas à deformação C-H de cadeias carbônicas e deformações C-O e 920-750 cm^{-1} associadas à deformações de ligações C-H de anéis aromáticos substituídos também foram visualizadas no processo B.

Na análise dos espectros na região do infravermelho referentes ao processo B no decorrer da fermentação (FIGURAS 19, 20 e 21), percebe-se que as principais mudanças ocorridas na composição das amostras foram similares às apresentadas pelo processo A. A diferença mais visível foi na região de 1750-1610 cm^{-1} sugestiva de estiramento C=O e C=C, de compostos fenólicos e taninos (COZZOLINO et al., 2004). Essas diferenças na composição fenólica dos processos A e B foram visualizadas também nas análises com cromatografia líquida de alta eficiência.

FIGURA 19 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “B” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS E ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus* NO TEMPO ZERO HORA DE FERMENTAÇÃO.

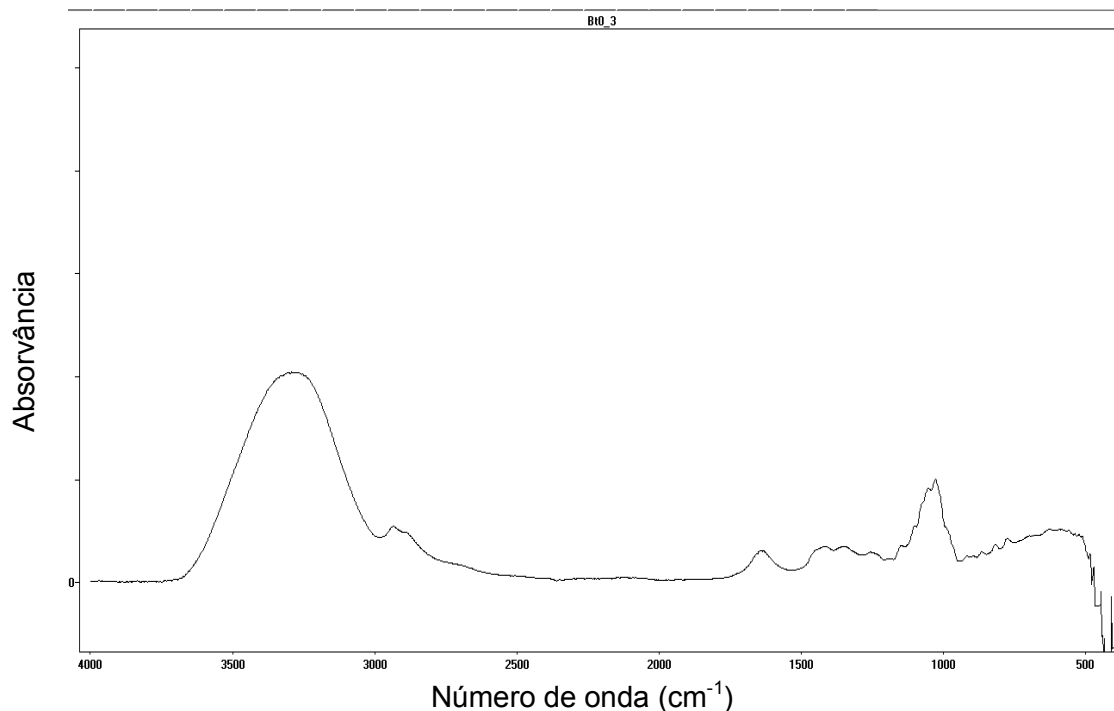


FIGURA 20 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “B” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS E ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus* EM 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO.

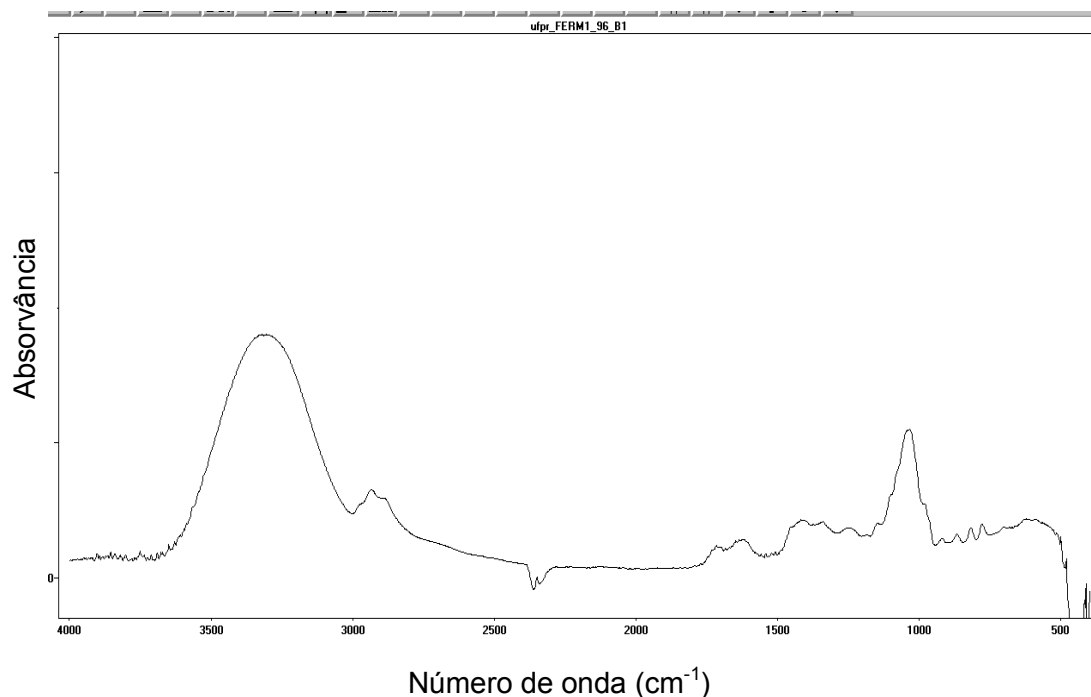
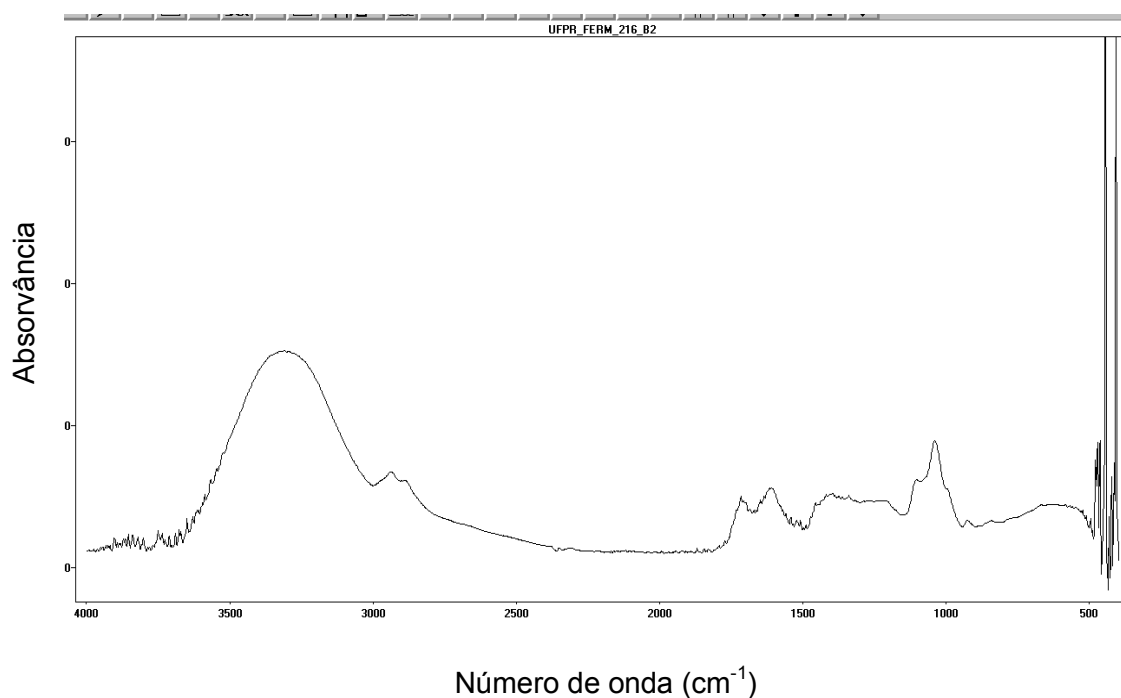


FIGURA 21 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “B” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS E ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus* EM 168 HORAS DE FERMENTAÇÃO.



As FIGURAS 22, 23 e 24 mostram os espectros na região do infravermelho do processo D utilizando mosto de uva com películas sulfitado e adição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* nos tempos zero, 96 e 168 horas de processo, respectivamente, compreendendo a faixa espectral de 4000 a 500 cm^{-1} . As bandas do processo D no tempo zero sugeriram que houve diferenças referentes às bandas observadas nos processos A e B no mesmo tempo, principalmente na região 1150-1010 cm^{-1} referente a deformações de ligações C-O e O-H de álcool, açúcares e ácidos orgânicos. As bandas em 3300 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} , e as regiões 1450-1250 cm^{-1} e 920-750 cm^{-1} também foram visualizadas no processo D.

Assim como nos espectros dos processos A e B as principais alterações percebidas nos espectros do processo D ao longo da fermentação ocorreram nas regiões 1750- 1610 cm^{-1} sugestiva de estiramentos C=O e C=C, 1450-1250 cm^{-1} relacionadas a deformação C-H de cadeias carbônicas e deformações C-O de ácidos e ésteres e 1150-1010 cm^{-1} associadas a deformação O-H e C-O (BOULET, WILLIAMS, DOCO, 2007; COZZOLINO et al., 2004).

Apesar das pequenas modificações observadas ao longo das fermentações, a simples análise visual dos espectros na região do infravermelho não foi suficiente para detectar diferenças substanciais de um processo para o outro.

FIGURA 22 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “D” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS SULFITADO E ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus* NO TEMPO ZERO HORA DE FERMENTAÇÃO.

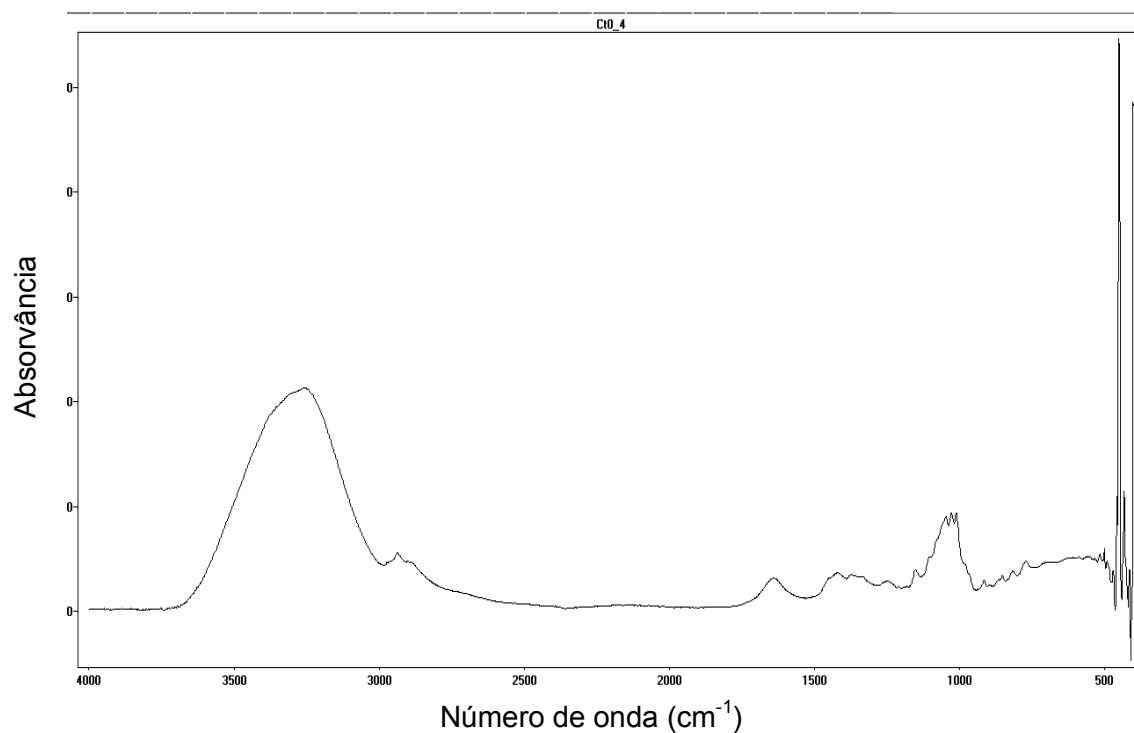


FIGURA 23 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROVINIFICAÇÃO “D” UTILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS SULFITADO E ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus* EM 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO.

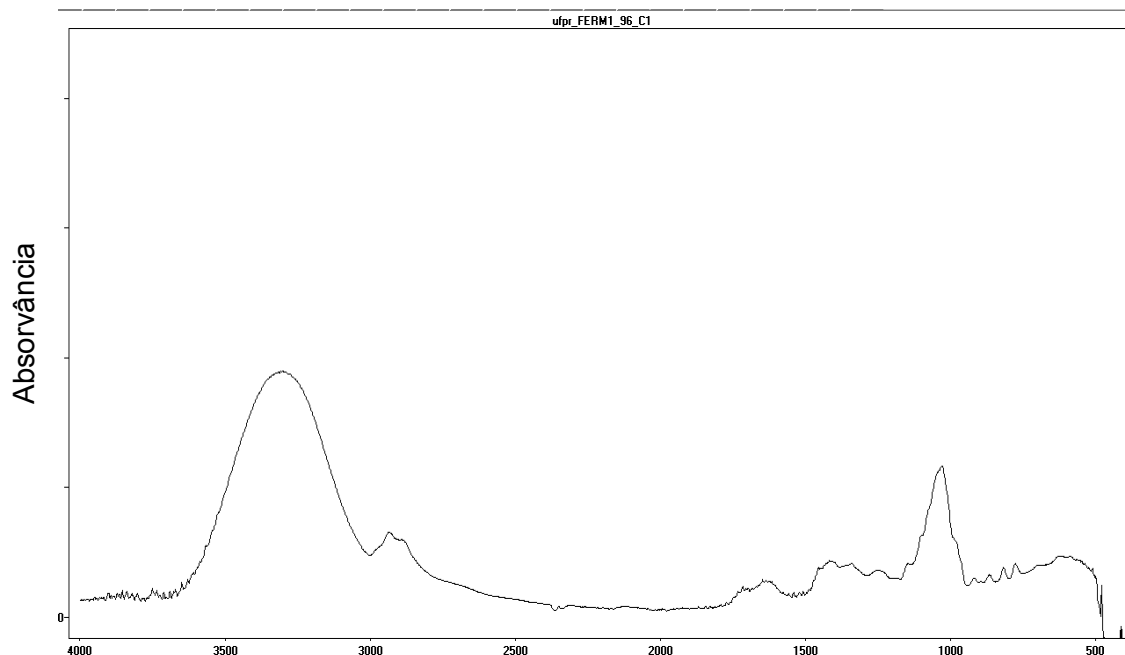
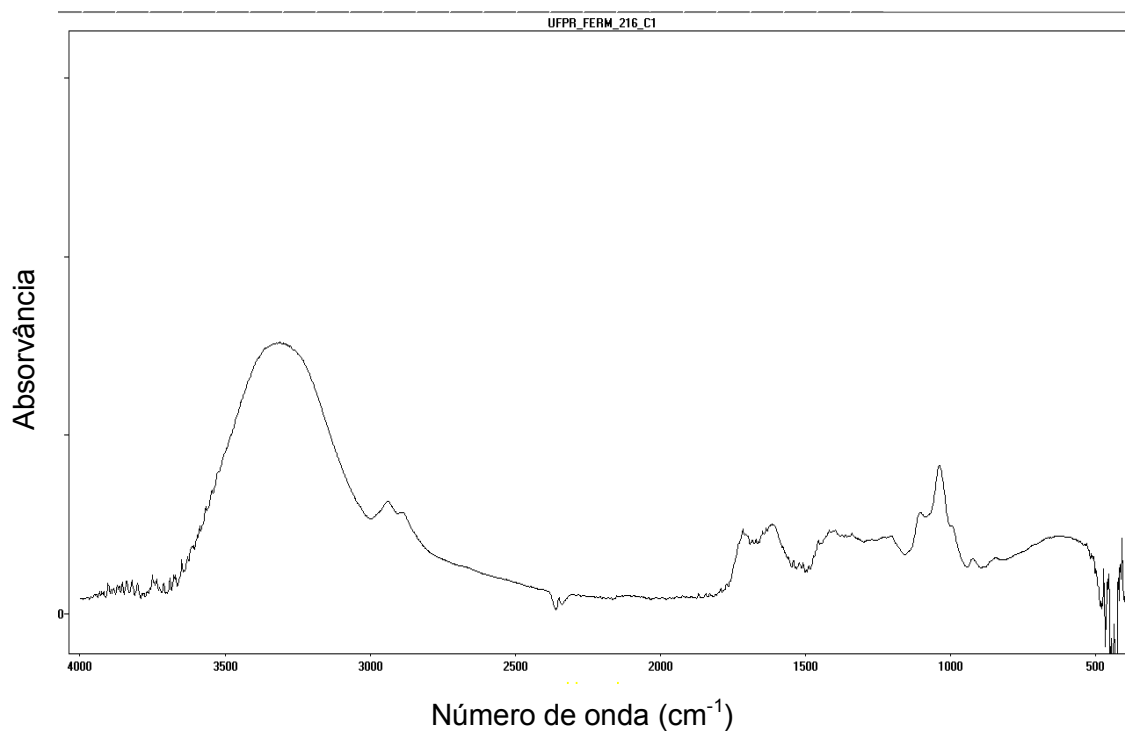


FIGURA 24 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PROCESSO DE MICROBILIZANDO MOSTO DE UVA COM PELÍCULAS SULFITADO E ADIÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* VARIEDADE *bayanus* EM 168 HORAS DE FERMENTAÇÃO.



5.1.5 Quimiometria

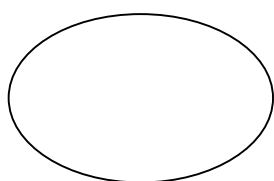
Em decorrência da dificuldade de análise visual e do elevado número de variáveis proveniente dos espectros no infravermelho, fez-se necessária a utilização de uma ferramenta estatística para auxiliar a interpretação dos resultados. O método escolhido foi a Análise de Componentes Principais (PCA). A análise de componentes principais é um procedimento matemático que transforma os dados espectrais em componentes ortogonais, que são combinações lineares dos dados originais. Dessa maneira, a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões (REICH, 2005).

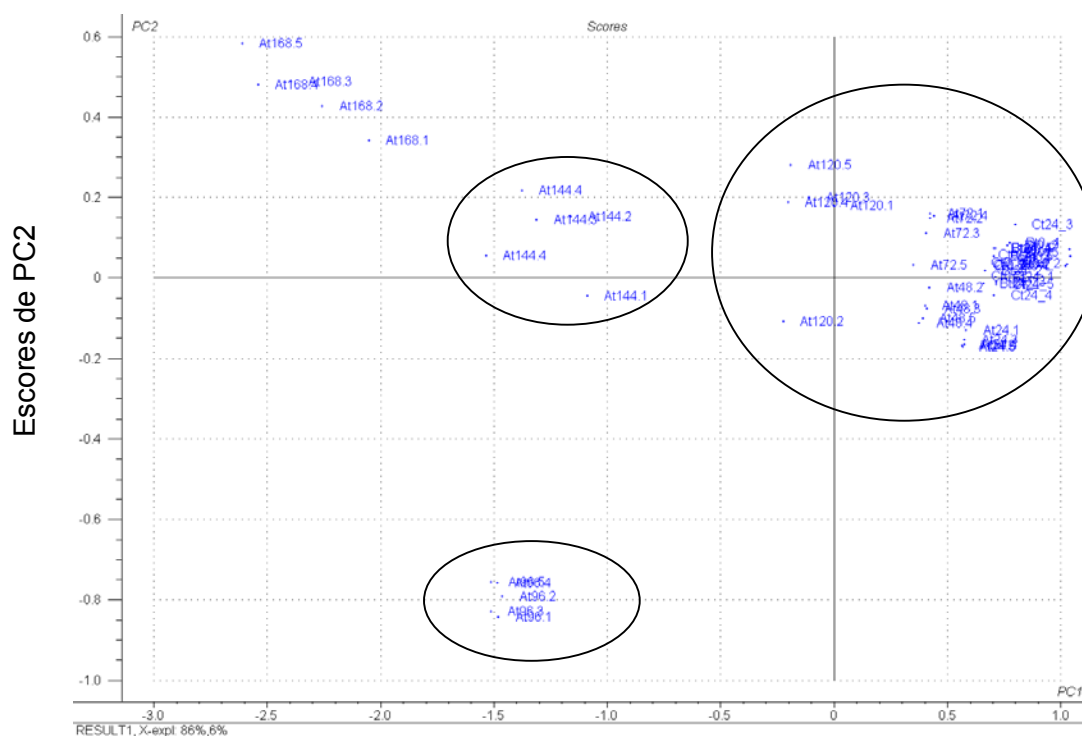
O primeiro componente principal (PC1) representa a máxima variância associada a todas as combinações lineares dos dados espectrais originais, e cada componente sucessivo (PC2, PC3, PC4, PCn) representa a variância não representada por PC1 (MARTENS, NAES, 1996).

A partir dos resultados obtidos com os espectros no infravermelho dos processos de microvinificação A, B e D, foram calculados dois componentes principais (PC1 e PC2). Os componentes PC1 e PC2 permitiram explicar 92% da variância dos processos de microvinificação, sendo que o primeiro componente principal (PC1) explicou 86% da variância dos dados espectrais e o segundo componente principal (PC2) 6%.

Na FIGURA 25 está representada a distribuição fatorial dos dados espectrais dos processos de microvinificação A, B e D nos tempos zero, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas de processo fermentativo. Os pontos nos gráficos, ou escores, representam as projeções dos dados espectrais dos processos A, B e D no novo conjunto de componentes principais (PC1 e PC2). Neste caso cada escore representa uma amostra de um dos processos de microvinificação.

FIGURA 25 – GRÁFICO DOS ESCORES DE PC1 E PC2 DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZANDO ESPECTROS NO INFRAVERMELHO DOS PROCESSOS DE MICROVINIFICAÇÃO A, B E D NOS TEMPOS ZERO, 24, 48, 72, 96, 120, 144 E 168 HORAS DE PROCESSO FERMENTATIVO.





Escores de PC1

Nota: Processos de microvinificação

A: Mosto de uva sem películas com adição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus*.

B: Mosto de uva com películas e adição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus*.

D: Mosto de uva com películas sulfitado e adição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus*.

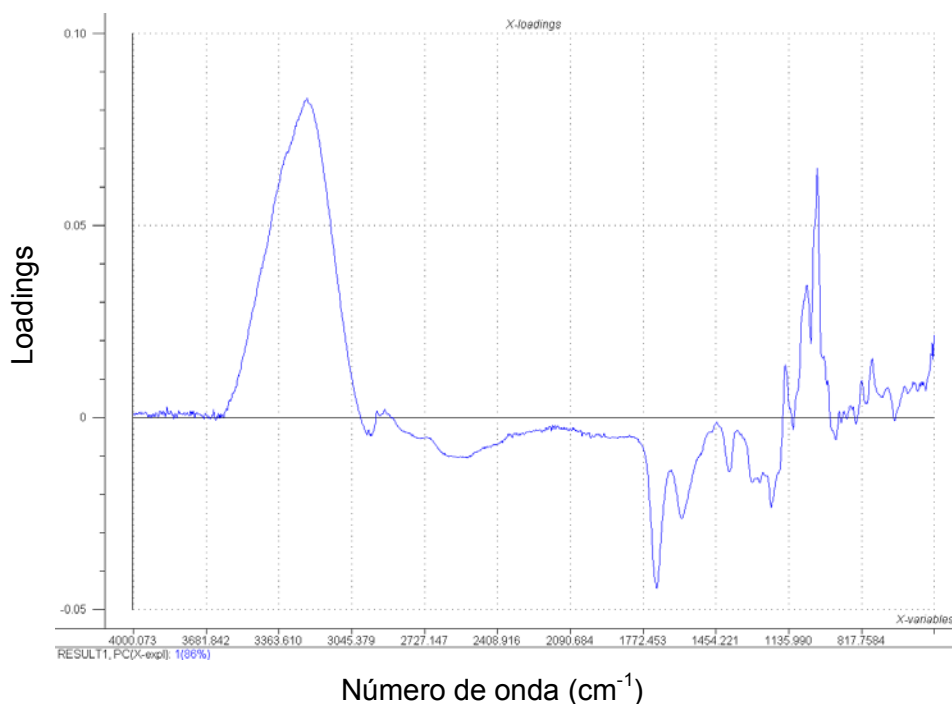
É possível perceber quatro grupos na FIGURA 25. O grupo maior inclui todos os dados espectrais dos processos de microvinificação B e D, e das amostras referentes aos tempos zero, 24, 48, 72 e 120 horas do processo de microvinificação A. Os outros três grupos são formados exclusivamente por dados espectrais das amostras do processo A, sendo que um dos grupos reúne os escores referentes à amostra do tempo 96 horas, e os outros dois grupos os escores dos tempos 144 e 168 horas.

Os resultados do gráfico de distribuição fatorial (FIGURA 25) demonstram a similaridade dos dados. Dessa maneira a análise dos espectros no infravermelho dos processos de microvinificação A, B e D, pela análise de componentes principais, indica que os processos B e C foram similares entre si e apresentaram diferenças em relação ao processo A nas amostras de tempo 96, 144 e 168 horas.

O gráfico de contribuição fatorial do componente principal PC1 (FIGURA 26), foi construído a partir dos dados espectrais no infravermelho dos processos de microvinificação, e mostra os valores de *loadings*, que representam a influência de cada número de onda na determinação desse

componente, ou seja, representa o peso com que cada variável original contribuiu para a elaboração do novo componente principal. A análise da contribuição fatorial do primeiro componente principal (PC1) mostra as bandas dos dados originais dos espectros no infravermelho, que contribuíram para descrição de 86% da variação dos dados espectrais dos processos de microvinificação A, B e D.

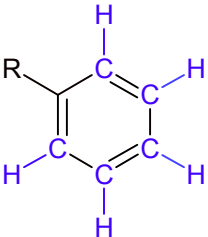
FIGURA 26 – GRÁFICO DOS LOADINGS DE PC1 DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZANDO ESPECTROS NO INFRAVERMELHO DOS PROCESSOS DE MICROVINIFICAÇÃO A, B E D NOS TEMPOS ZERO, 24, 48, 72, 96, 120, 144 E 168 HORAS DE PROCESSO FERMENTATIVO.



Os grupamentos funcionais correspondentes aos números de onda das bandas presentes no gráfico de *loadings* positivos e negativos referentes aos componentes principais PC1 (FIGURA 26) e PC2 (dado não mostrado) estão representados nas TABELAS 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

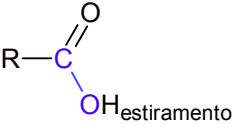
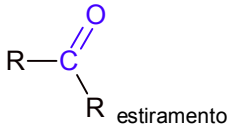
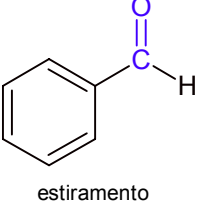
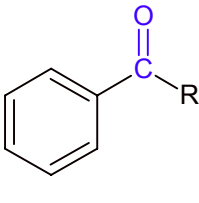
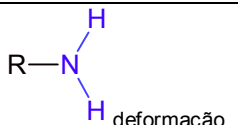
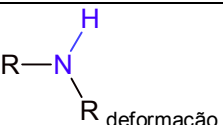
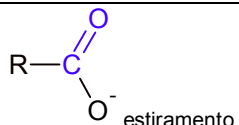
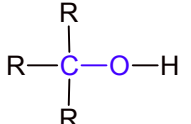
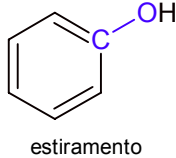
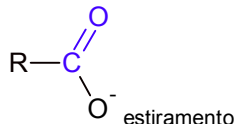
TABELA 2 – VALORES DE NÚMERO DE ONDA E SEUS RESPECTIVOS GRUPAMENTOS FUNCIONAIS, RELACIONADOS AOS *LOADINGS* POSITIVOS DO COMPONENTE PRINCIPAL PC1.

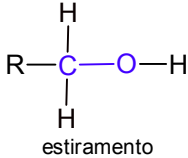
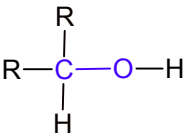
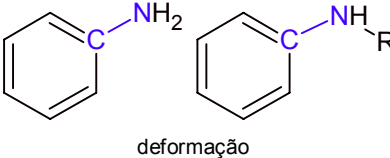
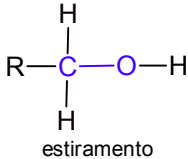
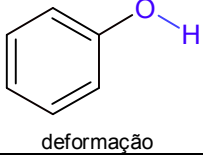
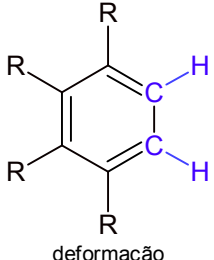
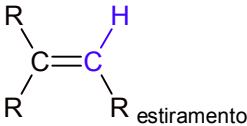
Número de onda.cm ⁻¹	Grupamentos funcionais correspondentes		
3215	$\text{R}-\text{O}-\text{H}$ estiramento	$\text{R}'\text{R}''\text{HC}-\text{H}$ estiramento	
1089	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{H}$ deformação	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{CH}-\text{O}-\text{H} \\ \\ \text{R} \end{array}$ deformação	
1008	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{R} \end{array}$ deformação		
819	$\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{R} \quad \text{R} \end{array}$ deformação	$\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{R} \quad \text{H} \end{array}$ deformação	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{R} \quad \text{C}=\text{C} \quad \text{H} \\ / \quad \backslash \\ \text{R} \quad \text{C}=\text{C} \quad \text{H} \\ \\ \text{R} \end{array}$ deformação

769	 deformação		
-----	---	--	--

NOTA: Nas estruturas, os átomos ou ligações marcados em azul são responsáveis pelo sinal mencionado, que pode ser deformação ou estiramento.

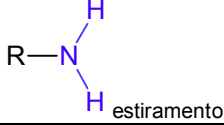
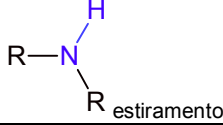
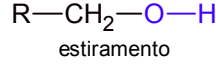
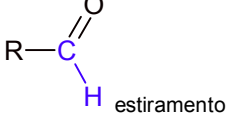
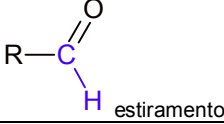
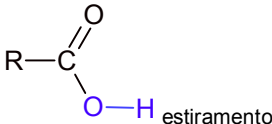
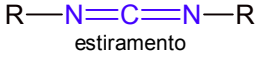
TABELA 3 – VALORES DE NÚMERO DE ONDA E SEUS RESPECTIVOS GRUPAMENTOS FUNCIONAIS, RELACIONADOS AOS *LOADINGS* NEGATIVOS DO COMPONENTE PRINCIPAL PC1.

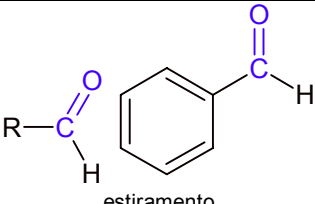
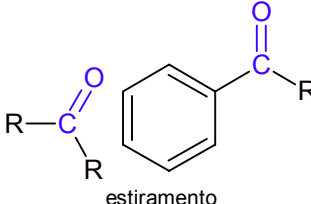
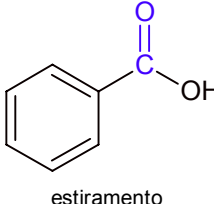
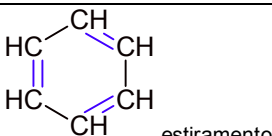
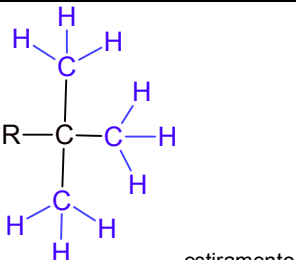
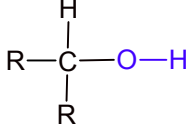
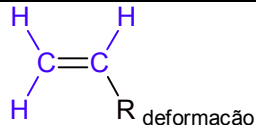
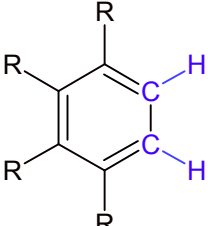
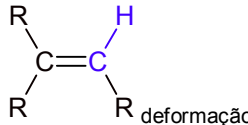
Número de onda.cm ⁻¹	Grupamentos funcionais correspondentes		
2536	 estiramento		
1714	 estiramento	 estiramento	 estiramento
1608	 deformação	 deformação	 estiramento
1404		 estiramento	 estiramento

	estiramento		
1299			
1267			
1213			
844			

NOTA: Nas estruturas, os átomos ou ligações marcados em azul são responsáveis pelo sinal mencionado, que pode ser deformação ou estiramento.

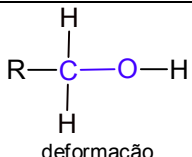
TABELA 4 – VALORES DE NÚMERO DE ONDA E SEUS RESPECTIVOS GRUPAMENTOS FUNCIONAIS, RELACIONADOS AOS LOADINGS POSITIVOS DO COMPONENTE PRINCIPAL PC2.

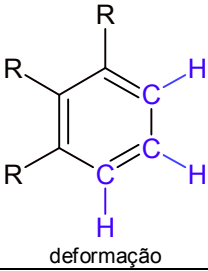
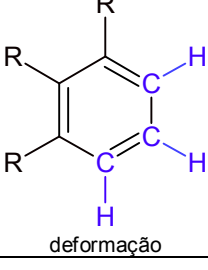
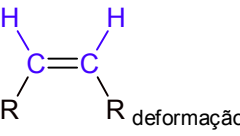
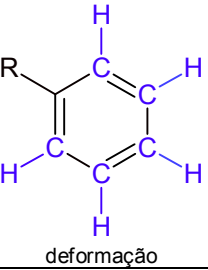
Número de onda.cm ⁻¹	Grupamentos funcionais correspondentes		
3303	R—O—H estiramento		
2904	R'R''HC—H estiramento		
2869	R'R''HC—H estiramento		
2580	R—O—H estiramento		
2156	R—C≡CH estiramento		

2150	$\text{R}-\text{C}\equiv\text{CH}$ estiramento	$\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}$ estiramento	
1706	 estiramento	 estiramento	 estiramento
1571	$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}^-$ estiramento	 estiramento	
1394	 estiramento	$\text{R}-\text{O}-\text{H}$ estiramento	
1108	 deformação		
989	 deformação		
840	 deformação	 deformação	

NOTA: Nas estruturas, os átomos ou ligações marcados em azul são responsáveis pelo sinal mencionado, que pode ser deformação ou estiramento.

TABELA 5 – VALORES DE NÚMERO DE ONDA E SEUS RESPECTIVOS GRUPAMENTOS FUNCIONAIS, RELACIONADOS AOS *LOADINGS* NEGATIVOS DO COMPONENTE PRINCIPAL PC2.

Número de onda. cm^{-1}	Grupamentos funcionais correspondentes		
1058	 deformação		

779			
771			
703			

NOTA: Nas estruturas, os átomos ou ligações marcados em azul são responsáveis pelo sinal mencionado, que pode ser deformação ou estiramento.

Os dados apresentados nas TABELAS 2, 3, 4 e 5, podem ser utilizados para explicar as diferenças entre os quatros grupos apresentados na FIGURA 25 (página 55).

Os grupamentos funcionais mostrados na TABELA 2, relativos ao componente principal PC1 (*loadings* positivos) estão relacionados ao grupo maior da FIGURA 25, ou seja, são referentes a todas as amostras dos processos de microvinificação B e D e das amostras dos tempos zero, 24, 48, 72, e 120 horas do processo de microvinificação A.

Em relação aos outros três grupos mostrados na FIGURA 25, as bandas que provavelmente explicam as diferenças do grupo formado pelas amostras do tempo 96 horas do processo de microvinificação A são as bandas descritas pelos valores de *loadings* negativos do primeiro e segundo componente principal (PC1 e PC2) apresentados nas TABELAS 3 e 5. Já as diferenças dos grupos que envolvem as amostras dos tempos 144 e 168 horas do processo de microvinificação A podem ser explicadas pelos valores de *loadings* negativos

do primeiro componente principal (PC1) e pelos valores de *loadings* positivos do segundo componente principal (PC2) demonstrados nas TABELAS 3 e 4.

Os grupamentos funcionais demonstrados nas TABELAS 3, 4 e 5 sugerem que os possíveis compostos relacionados com as diferenças observadas nos tempos 96, 144 e 168 horas do processo de microvinificação A sejam ácidos orgânicos como o ácido succínico e o ácido acético, álcoois superiores como o isopropanol e isobutanol, compostos fenólicos como ácido caféico e ácido p-coumárico, o estilbeno *trans*-resveratrol, entre outros compostos presentes no processo de vinificação em tintos.

6. CONCLUSÃO

A concentração final de etanol após 168 horas de fermentação no processo de microvinificação A, utilizando mosto de uva sem películas, foi de 13,72% v/v, no processo B, utilizando mosto de uva com películas, de 12,81% v/v e no processo D, utilizando mosto de uva com películas sulfitado de 12,91% v/v. A fermentação alcoólica foi completa em todos os processos de microvinificação com concentrações residuais de glucose entre 1,32 a 3,01 g/L e de frutose de 1,52 a 3,28 g/L. O consumo de glucose e frutose na produção de etanol apresentou diferença significativa em todos os processos. No processo A houve maior participação da frutose na produção de etanol, no processo D da glucose e no processo B não houve diferença.

O ácido succínico foi formado durante a fermentação alcoólica a partir de 96 horas, sendo a maior concentração determinada no processo de microvinificação B.

Durante a fermentação alcoólica não se verificou diferença significativa na concentração dos compostos fenólicos epicatequina, ácido cinâmico e quercetina liberados nos processos de microvinificação A, B e D. A concentração do ácido caféico foi diferente entre os processos A, B e D, enquanto a concentração de ácido p-coumárico apresentou diferença significativamente menor no processo A, comparado aos processos B e D. A concentração de *trans*-resveratrol no processo D foi significativamente menor em relação aos outros processos.

Os espectros obtidos pela espectroscopia na região do infravermelho possibilitaram a verificação das diferenças ocorridas durante a fermentação alcoólica nos processos de microvinificação A, B e D. A comparação dos espectros obtidos das amostras coletadas dos diferentes processos foi capaz de fornecer um perfil de alterações que ocorreram durante a fermentação alcoólica.

A análise por quimiometria dos espectros no infravermelho possibilitou a comparação dos dados espectrais das amostras dos processos de microvinificação A, B e D. Dois componentes principais (PC1 e PC2) foram capazes de explicar 92% da variância dos processos. A análise por quimiometria também indicou que os processos de microvinificação B e D foram similares entre si e diferentes do processo de microvinificação A, em relação às amostras 96, 144 e 168 horas. Os valores de *loadings* dos componentes principais PC1 e PC2 indicaram as bandas de grupamentos funcionais de compostos responsáveis pelas diferenças observadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Análisis de vinos y mostos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1976.

ARIKAWA, Y. et al. Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 87, p. 28-36, 1999.

AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia Industrial**. 1. ed. Edgard Blucher: São Paulo, 2001. v. 4.

BELTRÁN, N. H. et al. Feature extraction and classification of Chilean wines. **Journal of Food Engineering**. v. 75, p. 1-10, 2006.

BENASSI, M. T. **Metodologia analítica para avaliação de parâmetros físico-químicos e sensoriais de qualidade em vinhos Riesling Itálico nacionais**. 1997. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

BERTHELIS, N. J. et al. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **FEMS Yeast Research**. v. 4, p. 683-689, 2004.

BOULET, J. C.; WILLIAMS, P.; DOCO, T. A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**. v. 69, p. 79-85, 2007.

BOURGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. **Microbiologia Alimentaria**. 1. ed. Acribia: Zaragoza, 1995. v. 2.

BRASIL. Lei n. 7.678, de 08 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 nov. 1988a.

BRASIL. Portaria n. 229, de 25 de outubro de 1988. Aprova as normas referentes a "Complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho". **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 set. 1988b.

BRASIL. Lei n. 10.970, de 12 de novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei n. 7.678, de 08 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 nov. 2004. Seção I.

BRASIL. Instrução Normativa n. 24, de 08 de setembro de 2005. Aprova o "Manual Operacional de Bebidas e Vinagres". **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2005. Seção I.

CABAROGLU, T. Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing. **Food Control**. v. 16, p. 177-181, 2005.

CAMARGO, U. A. Cultivares e porta-enxertos para a produção de videiras em regiões frias. In: III SEMINÁRIO ESTADUAL DE FRUTICULTURA: TECNOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE VIDEIRAS, 2003, Palmas-PR. **Anais**, 2003.

CAPELLO, M. S. et al. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. **Journal of Applied Microbiology**. v. 97, p. 1274-1280, 2004.

CASTELLARI, M. et al. Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. **Journal of Chromatography A**. v. 973, p. 221-227, 2002.

CATALUÑA, E. **Uvas e vinhos**. Rio de Janeiro: Ed. Globo, 1984.

CHOCIAI, M. B. et al. **Elaboração de vinhos**. Curitiba: Imprensa Universitária da UFPR, 2000.

CHRISTAKI, T.; TZIA, C. Quality and safety assurance in winemaking. **Food Control**. v. 13, p. 503-517, 2002.

CIANI, M.; PEPE, V. The influence of pre-fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions. **Journal of the Science of Food and agriculture**. v. 82, p. 573-578, 2002.

COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**. v. 189, p. 81-87, 2000.

COLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997.

COPAT, L. A. A produção de uvas no Brasil e a problemática do vinho comum. **Revista do vinho**. v. 2, n. 19, p. 27-33, 1988.

CORDONNIER, R. Le methanol et ses origines dans le vin. **Progres Agricole et Viticole**. v. 104, p. 315-318, 1987. In: CABAROGLU, T. Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing. **Food Control**. v. 16, p. 177-181, 2005.

COZZOLINO, D. et al. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**. v. 513, p. 73-80, 2004.

DARIAS-MARTÍNS, J. et al. Comparative study of methods for determination of acidity in wine. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 16, p. 555-562, 2003.

DAUDT, C. E.; SIMON, J. A. Um método rápido para análise de glicose em mosto e sua quantificação em algumas cultivares do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**. v. 31, p. 697-701, 2001.

DORNELES, D. **Influência do emprego de variedades de *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração de vinho tinto de uva Terci oriunda do município de Colombo-PR**. 2003. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

DUBOURDIEU, D.; DONECHE, B.; LONVAUD, A. **Tratado de enologia**. Paris: P. Ribereau-Gaynon, 2003. v. 1.

ESCOBAL, A. et al. Liquid chromatographic determination of organic acids in txakoli from Bizkaia. **Food Chemistry**. v. 58, p. 381-384, 1997.

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**. v. 22, p. 724-731, 1999.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**. v. 86, p. 11-22, 2003.

FRANKEL, E. N. et al. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **Lancet**. v. 341, p. 454-457, 1993.

GAMBELLI, L.; SANTARONI, G. P. Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 17, p. 613-618, 2004.

GIL-MUÑOZ, R. et al. Evolution of phenolic compounds during wine fermentation and post-fermentation: Influence of grape temperature. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 12, p. 259-272, 1999.

GLORIES, Y.; DUBOURDIEU, D.; MAUJEAN, A. **Tratado de enologia**. Paris: P. Ribereau-Gaynon, 2003. v. 2.

GONZALEZ-NEVES, G. et al. Phenolic potencial of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. **Analytica Chimica Acta**. v. 513, p. 191-196, 2004.

GUERRA, C. C; TONIETTO, J. **Fatores de Qualidade de Vinhos**. Artigo Técnico. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

GUERRA, C. C. **Maturação e Colheita**. Artigo Técnico. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003a.

GUERRA, C. C. **Processamento**. Artigo Técnico. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003b.

HANSEN, J.; KIELLAND-BRANDT, M. C. Modification of biochemical pathways in industrial yeasts. **Journal of Biotechnology**. v. 49, p. 1-12, 1996.

HOLLMAN, P. C. H.; HERTOOG, M. G. L.; KATAN, M. B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**. v. 57, p. 43-46, 1996.

HYGINOV, C. **Elaboracion de Vinos**. 1. ed. Zaragoza: Ed. Acribia, 2000.

JANG, M. et al. Cancer chemopreventive activity of Resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**. v. 275, p. 218-220, 1997.

JOSHI, V. K.; PANDEY, A. **Biotechnology: Food Fermentation**. New Delhi : Educational Publishers & Distributors, 1999. v. 2.

KALLITHRAKA, S. et al. Principal phenolic compounds in Greek red wines. **Food Chemistry**. v. 99, p. 784-793, 2006.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 99, p. 213-218, 1999.

LEE, J.; RENNAKER, C. Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in Snake River Valley of Idaho. **Food Chemistry**. (2007), doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.069

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 3.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, J.; PEREZ-JUAN, P. Analytical Methods in Wineries: Is it time to change? **Food Reviews International**. v. 21, p. 231-265, 2005.

MAICAS, S. et al. Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. **Food Research International**. v. 32, p. 491-496, 1999a.

MAICAS, S. et al. Production of *Oenococcus oeni* biomass to induce malolactic fermentation in wine by control of pH and substrate addition. **Biotechnology Letters**. v. 21, p. 349-353, 1999b.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Avaliação da produção dos compostos majoritários de fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da Serra Gaúcha. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, n. 3, p. 453-458, 2004.

MANDIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 9. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2004.

MARASCHIN, R. P. et al. Solid-phase extraction and ¹H-NMR analysis of Brazilian Cabernet Sauvignon Wines - A chemical composition correlation

study. Proceedings Of The Royal Society Of London Series A-Mathematical And Physical Sciences, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 255-260, 2003.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. New York : John Wiley & Sons, 1996.

MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. A review of analytical methods to determine organic acids in grape juice and wines. **Food Research Internettional**. v. 38, p. 1175-1188, 2005.

MAZZA, G. et al. Anthocyanins, phenolic and colour of Cabernet Franc, Merlot and Pinot Noir wines from British Columbia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, p. 4009-4017, 1999.

MOREIRA, J. L.; SANTOS, L. Spectroscopic interferences in Fourier transform infrared wine analysis. **Analytica Chimica Acta**. v. 513, p. 263-268, 2004.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. Winemaking: Biochemistry and Microbiology current knowledge and future trends. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 45, p. 265-286, 2005.

NETZEL, M. et al. Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red wine. **Journal of Food Engineering**. v. 56, p. 223-228, 2003.

NIEUWOUDT, H. H. et al. Rapid screening of the fermentation profiles of wines yeasts by Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Microbiological Methods**. v. 67, p. 248-256, 2006.

NOVO, M. T. et al. Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation, rehydration and low temperature fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 86, p.153-161, 2003.

OUGH, C. S.; AMERINE, M. A. **Methods for analysis of must and wines**. New York: John Wiley & Sons, 1988. In: CABAROGLU, T. Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing. **Food Control**. v. 16, p. 177-181, 2005.

PATO, O. **O vinho, sua preparação e conservação**. 6. ed. Lisboa: Livraria Clássica Editora, 1978.

PÉREZ-COELLO, M. S. et al. Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region. **Food Microbiology**. v. 16, p. 563-573, 1999.

PISKUR, J. et al. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **TRENDS in Genetics**. v. 22, p. 183-186, 2006.

PRETORIUS, I. S. **Handbook of fungal biotechnology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2004.

REDZEPOVIC, S. et al. Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 83, p. 49-61, 2003.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 57, p. 1109-1143, 2005.

RENAULD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**. v. 339, p. 1523-1526, 1992.

REVILLA, E. et al. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wine made from them. **Journal of Chromatography A**. v. 915, p. 53-60, 2001.

REVILLA, I.; GONZALES-SANJOSE, M. L. Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes. **Food Chemistry**. v. 63, p. 307-312, 1998.

RIBEREAU-GAYON, P. et al. **Handbook of enology**. New York: John Wiley & Sons, 2000. v. 2. In: CABAROGLU, T. Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing. **Food Control**. v. 16, p. 177-181, 2005.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet Sauvignon para a elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 192-198, 2002a.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Acidez na vinificação em tinto das uvas Isabel, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc. **Ciência Rural**. v. 32, p. 511-515, 2002b.

ROBINSON, J. **Curso de vinhos**. Lisboa: Ed. Cotovia, 1999.

ROIG, B.; THOMAS, O. UV monitoring of sugars during wine making. **Carbohydrate Research**. v. 338, p. 79-83, 2003.

SANTOS, J. I. **Vinhos, o essencial**. 3. ed. São Paulo: Ed. Senac, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 4. ed. New York: John Wiley and Sons, 1981.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 2. ed. Editora da UFSC/ Editora Universidade: Florianópolis/Porto Alegre, 2000.

SUBDEN, R. E. et al. Mutational analysis of malate pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. **Food Research International**. v. 31, p. 37-42, 1998.

TORRES, A. G. **Avaliação de compostos fenólicos em vinhos tintos brasileiros Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e Merlot**. 2002. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

TORIJA, M. J. et al. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 80, p. 47-53, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

URTUBIA, A. et al. Monitoring large scale wine fermentations with infrared spectroscopy. **Talanta**. v. 64, p. 778-784, 2004.

UVIBRA, UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA. Disponível em: <<http://www.uvibra.com.br>> Acesso em 17 jan. 2007.

VALERO, E. et al. Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. **Food Chemistry**. v. 78, p. 57-61, 2002.

VOGT, E. **El vino: obtención, elaboración y análisis**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1984.

VONACH, R.; LENDL, B.; KELLNER, R. High-performance liquid chromatography with real-time Fourier-transform infrared detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines. **Journal of Chromatography A**. v. 824, p. 159-167, 1998.

WADE, L. G. **Organic Chemistry**. 5. ed. Dallas: Prentice Hall, 2003.

WALKER, T. et al. Analysis of wine components in Cynthiana and Sirah wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 1543-1547, 2003.

YALÇIN, S. K.; OZBAS, Z. Y. Effects of different substrates on growth and glycerol production kinetics of wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Narince 3. **Process Biochemistry**. v. 39, p. 1285-1291, 2004.

ZOECKLEIN, B. W. et al. **Análisis y producción de vino**. Zaragoza: Ed. Acribia, 2001.

ZOTOU, A.; LOUKOU, Z.; KARAVA, O. Method development for the determination of seven organic acids in wines by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Chromatographia**. v. 60, p. 39-44, 2004.

